



**“ESTUDIO Y APLICACIÓN DE NUEVAS
ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS PARA LA
MEJORA DE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE
LOS VINOS”**

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y
Tecnologías del Medio Ambiente**

Ana María Roldán Gómez

Septiembre 2008

**“ESTUDIO Y APLICACIÓN DE NUEVAS ALTERNATIVAS
TECNOLÓGICAS PARA LA MEJORA DE LA PRODUCCIÓN Y
CALIDAD DE LOS VINOS”**

Memoria presentada por la Licenciada en C. Químicas Ana María Roldán Gómez para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Cádiz

Fdo.: Ana María Roldán Gómez

Puerto Real, 31 de Julio de 2008

La presente Tesis Doctoral ha sido co-dirigida por los Doctores D. Luis Pérez Rodríguez, Catedrático de Tecnología de Alimentos y D. Víctor Manuel Palacios Macías, Profesor Titular de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Fdo.: Dr. D. Luis Pérez Rodríguez

Fdo.: Dr. D. Víctor Manuel Palacios Macías

Fdo.: Dra. D.^a Clara Pereyra López

Directora del Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del
Medio Ambiente
Universidad de Cádiz

A mis padres, Manuel y María.

Os debo todo lo que soy y lo que tengo.

A mis hermanos, Manolo, María del Mar y Soledad.

Gracias por estar ahí.

A mi hijo, Marco.

Te quiero "infinito".

*Existe al menos un rincón del universo
que con toda seguridad puedes mejorar,
y eres tú mismo.*

Aldous Huxley

Cuando consigues alcanzar una de tus metas no puedes dejar de mirar atrás y pensar en que han sido muchos los años de esfuerzo y trabajo duro. En que durante esos años tu vida ha cambiado y... ¡cuánto ha cambiado!. Sin embargo, afortunadamente, también hay cosas que no cambian y es la ayuda, el cariño y la amistad que me han prestado siempre todos aquellos que me rodean y que comparten conmigo el día a día.

Sois muchos en mi lista y mucho lo que tengo que agradecerlos. Para mí sois todos especiales y todos habéis aportado a mi trabajo y a mi vida vuestro granito de arena.

¡GRACIAS!

Gracias por estar siempre ahí cuando os necesito, en los momentos buenos y malos. Gracias por velar por mí, incluso cuando no me doy cuenta. Gracias por tenderme una mano, o las dos, cuando hace falta. Gracias por creer en mí cuando yo misma dudo. Gracias por ser mi pañuelo de lágrimas y de consuelo. Gracias por alegrarme el día con una simple sonrisa. Gracias por convertirme en parte de vuestras vidas. Siempre os estaré inmensamente agradecida.

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado la demanda de vinos jóvenes frescos y aromáticos con un marcado carácter varietal. Esta demanda ha conducido, a su vez, a que se potencie la aplicación de nuevas técnicas de vinificación, como el empleo de cepas de levaduras productoras de aromas, enzimas con actividad β -glucosidasa y técnicas prefermentativas como la maceración pelicular, como alternativas a la mejora del carácter aromático de los vinos.

Sin embargo, el empleo de estas técnicas no conduce siempre a resultados favorables. Las características propias de cada variedad, el proceso de maduración, el estado sanitario de la uva y el tratamiento mecánico de la vendimia son factores que influyen de manera determinante en la composición y la calidad final del mosto y el vino resultante.

Este trabajo plantea como principal objetivo la mejora de la producción y la calidad de los vinos blancos mediante la puesta a punto de nuevas alternativas enológicas que potencien tanto la calidad del producto obtenido como la calidad del proceso empleado. Para alcanzar dicho objetivo se ha establecido el desarrollo de tecnologías capaces de mejorar la riqueza aromática de los vinos blancos jóvenes de la región, elaborados a partir de las variedades de uva autóctonas de la zona de Cádiz, *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*. Entre dichas alternativas se han estudiado la maceración pelicular y la supraextracción, como técnicas prefermentativas, el empleo de cepas de levadura comerciales con características específicas en la fermentación, y el empleo de extractos enzimáticos comerciales con actividad β -glucosidasa como tratamiento postfermentativo.

| | |
|---|-----------|
| I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 3 |
| II. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS VINOS DE LA TIERRA DE CÁDIZ..... | 9 |
| III. ANTECEDENTES | 19 |
| III.1. INTRODUCCIÓN | 19 |
| III.2. ELABORACIÓN TRADICIONAL DE VINOS BLANCOS | 29 |
| III.2.1. FASE PREFERMENTATIVA | 30 |
| 2.1.1. Despalillado | 30 |
| 2.1.2. Estrujado o molturado | 30 |
| 2.1.3. Escurrido | 31 |
| 2.1.4. Prensado | 32 |
| 2.1.5. Correcciones prefermentativas..... | 33 |
| 2.1.6. Desfangado..... | 34 |
| III.2.2. FASE DE FERMENTACIÓN | 39 |
| 2.2.1. Fermentación alcohólica | 39 |
| 2.2.2. Fermentación maloláctica (opcional) | 43 |
| III.2.3. FASE POSTFERMENTATIVA..... | 45 |
| 2.3.1. Clarificación y conservación..... | 45 |
| III.3. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO DE AROMAS | 47 |
| III.3.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN | 48 |
| 3.1.1. Maceración pelicular..... | 48 |
| 3.1.1.1. Influencia sobre la acidez de mostos y vinos..... | 50 |
| 3.1.1.2. Influencia sobre el contenido en polifenoles de mostos y vinos..... | 51 |
| 3.1.1.3. Influencia sobre el contenido en nitrógeno de mostos y vinos..... | 54 |
| 3.1.1.4. Influencia sobre el contenido en polisacáridos de mostos y vinos | 55 |
| 3.1.1.5. Influencia sobre el contenido en ácidos grasos de mostos y vinos..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.1.6. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles de mostos y vinos | 57 |
| 3.1.1.7. Influencia sobre las características organolépticas de los vinos..... | 60 |
| 3.1.1.8. Importancia de la temperatura y el tiempo de maceración sobre el proceso | 61 |
| 3.1.2. Supraextracción..... | 63 |
| III.3.2. MÉTODOS DE LIBERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE AROMAS | 67 |
| 3.2.1. Aplicación de preparados enzimáticos..... | 69 |
| 3.2.2. Empleo de cepas de levaduras..... | 76 |
| IV. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 91 |
| IV.1. PROTOCOLO DE TRABAJO..... | 91 |
| IV.1.1. PROCEDIMIENTOS COMUNES DE ELABORACIÓN | 91 |
| 1.1.1. Despalillado-molturado | 91 |
| 1.1.2. Prensado..... | 93 |
| 1.1.3. Correcciones prefermentativas..... | 93 |
| 1.1.4. Desfangado | 94 |
| 1.1.5. Fermentación..... | 94 |
| 1.1.6. Clarificación, filtración y embotellado..... | 95 |
| IV.1.2. PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS DE ELABORACIÓN..... | 95 |
| 1.2.1. Ensayos de maceración pelicular..... | 95 |
| 1.2.2. Ensayos de supraextracción..... | 96 |
| 1.2.3. Ensayos de empleo de cepas de levadura específicas | 96 |
| 1.2.4. Ensayos de adición de enzimas | 98 |
| 1.2.4.1. Determinación de la actividad β -glucosidasa | 98 |
| IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS UVAS, MOSTOS Y VINOS | 99 |
| IV.2.1. CARACTERIZACIÓN DE UVAS | 100 |
| 2.1.1. Microscopía electrónica de barrido..... | 100 |
| IV.2.2. CARACTERIZACIÓN DE MOSTOS | 102 |
| 2.2.1. Análisis general en todas las muestras de mosto | 102 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.1.1. Determinación del grado Beaumé | 102 |
| 2.2.1.2. Determinación del pH | 102 |
| 2.2.1.3. Determinación de la acidez total..... | 102 |
| 2.2.1.4. Determinación de la turbidez | 103 |
| 2.2.1.5. Determinación de absorbancias a 280 y 470 nm..... | 103 |
| 2.2.1.6. Determinación de ácido málico y ácido glucónico | 103 |
| 2.2.1.7. Determinación de cationes..... | 104 |
| 2.2.1.8. Determinación de nitrógeno asimilable..... | 104 |
| 2.2.2. Análisis específicos para muestras de maceración pelicular y supraextracción | 105 |
| 2.2.2.1. Recuento de partículas por tamaño | 105 |
| 2.2.2.2. Porcentaje de fangos | 106 |
| 2.2.3. Seguimiento de la fermentación | 106 |
| 2.2.3.1. Determinación de la densidad | 106 |
| 2.2.3.2. Determinación de la biomasa | 107 |
| IV.2.3. CARACTERIZACIÓN DE VINOS | 108 |
| 2.3.1. Análisis general en todas las muestras de vino | 108 |
| 2.3.1.1. Determinación del grado alcohólico | 108 |
| 2.3.1.2. Determinación de azúcares residuales..... | 109 |
| 2.3.1.3. Determinación del pH | 110 |
| 2.3.1.4. Determinación de la acidez total..... | 110 |
| 2.3.1.5. Determinación de la acidez volátil..... | 110 |
| 2.3.1.6. Determinación de anhídrido sulfuroso | 110 |
| 2.3.1.7. Determinación de glicerina | 111 |
| 2.3.1.8. Determinación de absorbancias a 280 y 470 nm..... | 111 |
| 2.3.1.9. Determinación de la estabilidad oxidativa..... | 112 |
| 2.3.1.10. Determinación de cationes | 112 |
| 2.3.1.11. Evaluación del color | 112 |
| 2.3.1.12. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios..... | 114 |
| IV.3. ANÁLISIS DE AROMAS | 115 |
| IV.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS | 115 |

| | |
|--|---------|
| IV.3.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)..... | 115 |
| 3.2.1. Equipo | 115 |
| 3.2.2. Metodología..... | 116 |
| IV.3.3. ANÁLISIS MEDIANTE GASES-MASAS (GC-MM) | 117 |
| 3.3.1. Equipo | 117 |
| 3.3.2. Metodología..... | 118 |
| 3.3.2.1. Método cromatográfico..... | 118 |
| 3.3.2.1. Cuantificación de compuestos de interés | 118 |
| IV.3.4. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE AROMA | 119 |
| IV.4. ANÁLISIS SENSORIAL | 122 |
| IV.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS | 123 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 127 |
| V.1. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MACERACIÓN PELICULAR SOBRE LA ELABORACIÓN SOBRE LA ELABORACIÓN DE VINOS DE <i>Palomino fino</i> Y <i>Moscatel de Alejandría</i> | 128 |
| V.1.1. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MOSTO..... | 128 |
| V.1.2. INFLUENCIA SOBRE EL DESFANGADO..... | 132 |
| V.1.3. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA | 139 |
| V.1.4. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO | 141 |
| V.1.5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO..... | 144 |
| V.1.6. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO... .. | 147 |
| 1.6.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios | 147 |
| 1.6.2. Caracterización comparativa en aromas minoritarios de los vinos testigo de <i>Palomino fino</i> y <i>Moscatel de Alejandría</i> | 151 |
| 1.6.3. Influencia de la maceración sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios | 157 |

| | |
|---|-----|
| 1.6.4. Influencia sobre el valor de aroma | 166 |
| V.1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS..... | 170 |
| V.1.8. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO | 177 |
| V.2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE SUPRAEXTRACCIÓN SOBRE LA ELABORACIÓN DE VINOS <i>Palomino fino</i> Y <i>Moscatel de Alejandría</i> | 181 |
| V.2.1. INFLUENCIA SOBRE EL TEJIDO CELULAR DEL GRANO..... | 181 |
| V.2.2. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MOSTO..... | 185 |
| V.2.3. INFLUENCIA SOBRE EL DESFANGADO..... | 187 |
| V.2.4. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA | 190 |
| V.2.5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO | 192 |
| V.2.6. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO | 195 |
| V.2.7. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO.... | 197 |
| 2.7.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios | 198 |
| 2.7.2. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios..... | 200 |
| 2.7.3. Influencia sobre el valor de aroma..... | 204 |
| V.2.8. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO | 208 |
| V.3. EMPLEO DE CEPAS DE LEVADURA ESPECÍFICAS EN LA ELABORACIÓN DE VINOS DE <i>Palomino fino</i> Y <i>Moscatel de Alejandría</i> | 210 |
| V.3.1. INFLUENCIA DE LA CEPA DE LEVADURA SOBRE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA | 210 |
| V.3.2. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO | 212 |
| V.3.3. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO | 214 |
| V.3.4. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO.... | 216 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios | 216 |
| 3.4.2. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios..... | 220 |
| 3.4.3. Influencia sobre el valor de aroma..... | 225 |
| V.3.5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO | 229 |
| V.4. EMPLEO DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES PARA LA MEJORA AROMÁTICA DE LOS VINOS <i>Palomino fino</i> y <i>Moscatel de Alejandría</i> | 231 |
| V.4.1. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO | 231 |
| V.4.2. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO | 234 |
| V.4.3. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO... .. | 237 |
| 4.3.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios | 237 |
| 4.3.2. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios..... | 243 |
| 4.3.3. Influencia sobre el valor de aroma..... | 248 |
| V.4.4. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO | 253 |
| V.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO DE LAS DISTINTAS TÉCNICAS EMPLEADAS..... | 255 |
| VI. USE OF <i>Trichoderma</i> ENZYMATIC EXTRACTS ON VINIFICATION OF <i>Palomino fino</i> GRAPES IN THE SHERRY REGION | 265 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 289 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 297 |

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha producido un gran giro en el sector agroalimentario que ha afectado tanto al mercado nacional como extranjero. Los gustos y necesidades de los consumidores están continuamente cambiando, demandando productos de mejor calidad con una preocupación creciente por el efecto de su consumo sobre la salud y por las repercusiones del proceso productivo sobre el medio ambiente.

En el sector vitivinícola, estos cambios han conducido a un mercado cada vez más exigente en el que se apuesta por los vinos de calidad frente a los vinos básicos; se ha pasado del consumo de vinos blancos al consumo cada vez mayor de vinos tintos y rosados; y, aunque ciertos sectores de la población tienen sus gustos muy definidos y siguen decantándose por los productos tradicionales, la tendencia general de los consumidores va dirigida hacia la demanda de productos nuevos con características muy específicas.

En este sentido, la gran demanda de vinos tintos y blancos jóvenes, frescos y aromáticos ha revertido en una reconversión en el viñedo nacional en busca de variedades más apropiadas para la elaboración de este tipo de productos. Todo ello ha conducido a la replantación de los viñedos con variedades tintas como *Tempranillo*, *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Syrah*, etc y de variedades blancas aromáticas como *Sauvignon blanc* y *Chardonnay*. Sin embargo, dicha reconversión no resulta nada fácil, sobre todo para zonas importantes de producción, como es la del jerez, donde la realidad vitivinícola hace necesario poner en práctica otras alternativas.

Los viñedos del Marco de Jerez presentan unas características de suelo y climáticas de gran potencial vitícola dedicado en un 95% al cultivo de la variedad *Palomino fino* y, en menor medida a las variedades *Moscatel de Alejandría* y *Pedro Ximénez*, todas ellas variedades autóctonas de la zona de Cádiz. Sin embargo, desde el siglo XVIII hasta finales del siglo XX la producción de vinos dentro del Marco jerezano, y más tarde amparada por el Consejo

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Regulador, ha estado destinada principalmente a la elaboración de vinos generosos, de gran reconocimiento internacional, destinándose una pequeña parte a otros usos (vinagres, destilación y otros). No obstante, en el resto de la provincia se han elaborado durante décadas, vinos blancos y dulces destinados principalmente al consumo local e interno que se han mantenido prácticamente en el anonimato frente a otros mercados.

Ante el descenso de ventas de vinos generosos, detectado desde hace más de una década tanto en el mercado nacional como en el exterior, las empresas del sector se están adaptando a las nuevas demandas poniendo en práctica otras alternativas: productos de mayor calidad (vinos de Jerez con Vejez Calificada), replantación de viñedos (variedades tintas y blancas aromáticas) y elaboración de nuevos productos a partir de la materia prima existente. De hecho, atendiendo al último punto, desde el año 2000 muchas bodegas del Marco de Jerez dedican parte de su actividad a la elaboración de vinos blancos de la variedad *Palomino fino*, o mezcla de ésta con otras variedades blancas cultivadas en la zona, amparados bajo la denominación “Vinos de la Tierra de Cádiz”: vinos de mesa, vinos de aguja, vinos de licor y vinos de vendimia tardía que cumplen los requisitos establecidos por el Real Decreto 1126/2003, de 5 de septiembre.

Alguno de estos vinos, elaborado con 100% de la variedad *Palomino fino*, ha alcanzado gran fama a nivel nacional y, actualmente, se sitúa dentro de los más vendidos en España. Sin embargo, junto con otros vinos blancos de mesa obtenidos a partir de las variedades de uva cultivadas en la zona (principalmente *Palomino fino*, pero también *Moscatel*), al igual que ocurre en otras regiones vitivinícolas españolas, sobre todo del sur, en general, son vinos poco apreciados a nivel internacional y considerados como vinos de poca intensidad aromática y faltos de frescura. Esto hace necesario poner en práctica nuevas alternativas, tanto de cultivo (poda, riego, etc.) como tecnológicas (maceración, empleo de cepas de levadura y enzimas específicos, etc.), para intensificar el potencial aromático de los vinos y así diversificar la producción tradicional, adaptándola a las necesidades o demandas actuales, sin hipotecar la elaboración específica de estas zonas.

Algunas de estas alternativas, sobre todo tecnológicas, se están empleando actualmente en la zona a nivel industrial, pero los resultados obtenidos no son siempre los deseados ya que se aplican de forma generalizada sin tener en cuenta que no todos los procesos de elaboración son adecuados para todas las variedades, ni cuáles son las condiciones óptimas de trabajo en cada caso.

Este trabajo plantea como principal objetivo la mejora de la producción y la calidad de los vinos buscando y poniendo a punto nuevas alternativas enológicas que potencien tanto la calidad del producto obtenido como la calidad del proceso empleado. Para llevar a cabo este objetivo el trabajo se ha basado en el desarrollo de alternativas tecnológicas capaces de mejorar la riqueza aromática de los vinos blancos jóvenes de la región, elaborados a partir de las variedades de uva *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* autóctonas de la zona de Cádiz. Gran parte de este trabajo, recogido en este primer bloque, se inició con el Proyecto FEDER 1FD97-0820-C04-03, que lleva por título “EVALUACIÓN DE LAS REPERCUSIONES DE LA MEJORA GENÉTICA DE LEVADURAS SOBRE EL DESARROLLO DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LOS VINOS DE JEREZ” y posteriormente se continuó con el Proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología VIN01-046-C2-1, titulado “MEJORA DE LA TECNOLOGÍA MEDIANTE EL EMPLEO DE PIES DE CUBA AUTÓCTONOS SUPERPRODUCTORES DE AROMAS SECUNDARIOS Y DE TÉCNICAS PREFERMENTATIVAS DE EXTRACCIÓN PELICULAR EN LA ELABORACIÓN DE VINOS JÓVENES”.

Atendiendo a este planteamiento, el objetivo general se desglosa como sigue:

- 1) Desarrollo y aplicación de técnicas prefermentativas de enriquecimiento aromático basadas en operaciones de extracción, como la maceración pelicular y la supraextracción, como alternativa a la elaboración de vinos blancos. Todos ellos elaborados a partir de variedades autóctonas de la zona.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

- 2) Estudio de la influencia del empleo de variantes de cepas de levaduras, capaces de hidrolizar precursores del aroma o sintetizar más compuestos aromáticos durante la fermentación.
- 3) Estudio de la influencia de la aplicación de preparados enzimáticos, comerciales y de nueva obtención, con capacidad de liberar aromas o precursores aromáticos.
- 4) Estudio de la influencia de la combinación de algunas de técnicas empleadas, como el empleo de variantes de cepas de levaduras con la adición de distintos preparados enzimáticos.

II. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS VINOS DE LA TIERRA DE CÁDIZ

II. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS VINOS DE LA TIERRA DE CÁDIZ

Dentro del grupo de bebidas alcohólicas, el vino es la bebida alcohólica derivada de fruta con mayor producción y consumo. La Unión Europea ocupa un lugar preponderante en el mercado vitivinícola mundial, representando un 65% de la producción de todo el planeta. España sigue a Italia y Francia en la manufactura de productos derivados de la uva, como el vino (Riu-Aumatell, 2005).

Según datos de la Federación Española del Vino, la producción vitivinícola ha crecido fuertemente en España coincidiendo con la recuperación de los principales competidores, Italia y Francia, después de un descenso en la última década. Los datos recogidos por dicha Federación en la memoria de 2005 y 2006 muestran que el consumo interno de los vinos españoles ha bajado progresivamente desde 1987; sin embargo, el descenso más importante se ha producido en 2006 (-5,2% en volumen y -4% en valor). La tendencia negativa del consumo de vinos en España viene principalmente propiciada por el continuado descenso del consumo en hogares (-3% en 2006), junto con el también descenso, pero no tan acentuado, del consumo extradoméstico de vinos (bares, restaurantes, hoteles...), principalmente vinos de mesa y de calidad.

Atendiendo a las exportaciones, con datos de la Dirección General de Aduanas, elaborados por la FEV, disponibles hasta noviembre de 2006, el interanual a esta fecha se sitúa a 1.642 millones de euros por la exportación de 1.440 millones de litros, a un precio medio de 1,14 €/L. Comparando estas cifras con el cierre de 1995, la evolución relativa total supone el crecimiento de la facturación en un 53,7% y del volumen exportado en un 53,1%. Este crecimiento se ha debido, a un aumento generalizado del volumen y valor de vino exportado en todas las categorías, a excepción de los vinos de Jerez cuyo descenso en exportaciones ha supuesto más del 100% del volumen y de la facturación (Figura 1). Entre 2005 y 2006, se ha observado también un fuerte crecimiento de “otros vinos”, donde se sitúan los vinos de aguja y el vermut o vino aromatizado con subidas importantes del 35,5% y 27,2% de facturación y

volumen respectivamente, desde 2005 al 2006 (Figura 2). También cabe destacar, atendiendo a la Figura 2, el incremento relativo en exportaciones de vinos de mesa envasados, entre los cuales se sitúan los vinos de la tierra (3%), y la revalorización de dichos vinos junto con los vinos de D.O.

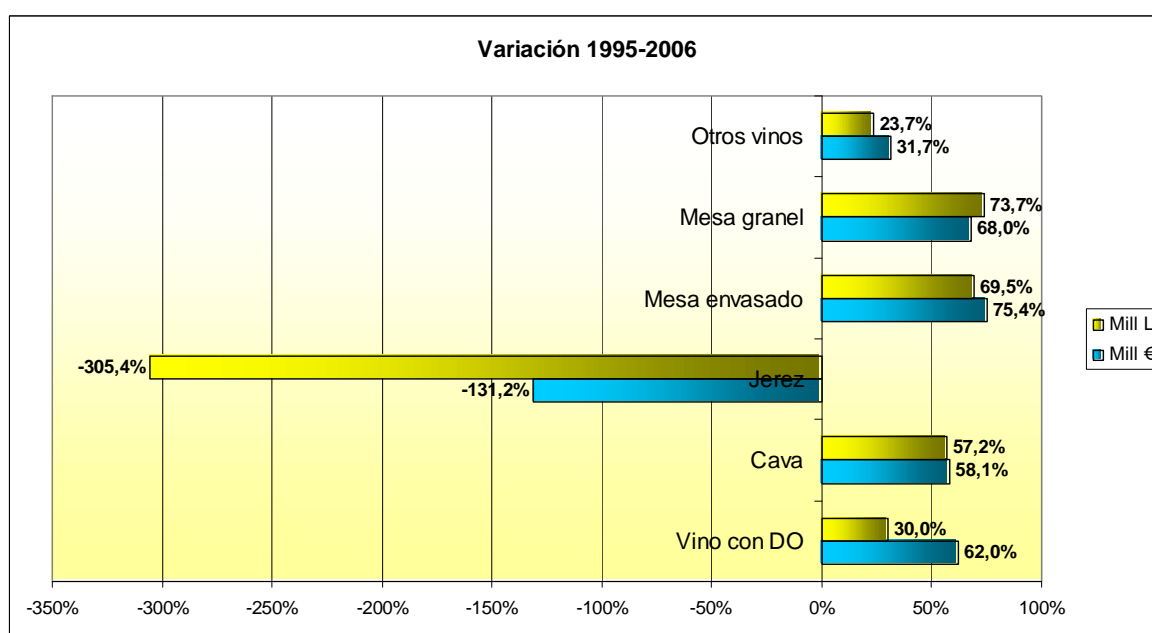


Figura 1. Variación de la facturación y volumen de exportaciones de vinos españoles en la última década

Atendiendo a la demanda, el continuo descenso de consumo interior unido al aumento de la población lleva a una cifra de consumo alrededor de los 24,9 L/habitante/año, por encima de los 19 L/habitante/año de la media europea, pero sin embargo, un descenso importante frente a los 27 L/habitante/año en 2005. Este descenso se debe principalmente a las pérdidas continuadas de consumo de vino de mesa en el hogar, sin embargo, en 2005-2006 ha afectado también a los vinos de calidad y de mesa en el sector extradoméstico. Como aspecto positivo de esta situación Ignacio Osborne (Presidente de la FEV) en su memoria anual destaca el aumento del consumo de los vinos de calidad (vinos envasados) en el hogar, especialmente los Vinos de la Tierra que, aunque no están amparados por las D.O., tienen calidad suficiente para distanciarse de los vinos de mesa, suponiendo un segmento con buenas perspectivas de futuro.

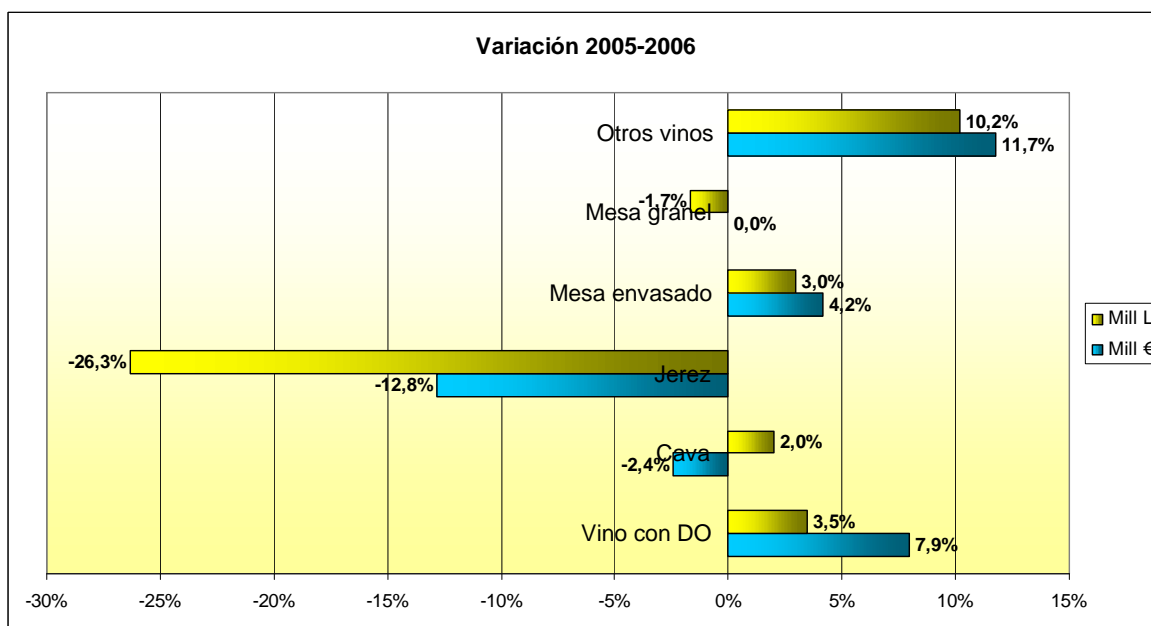


Figura 2. Variación del valor y volumen de exportaciones de vinos españoles desde 2005 hasta noviembre de 2006.

Junto con los vinos envasados de mesa (16%) y con D.O. (5,5%), los vinos de la Tierra van aumentando su volumen exportado (15%), aunque en valor los incrementos son modestos, señal inequívoca de la gran competencia que existe en el exterior, especialmente en los comercios de Reino Unido, EEUU o Alemania.

Según datos de la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB, 2001), la tendencia general del mercado es una mayor demanda de vinos de calidad en detrimento del vino joven de mesa. Por esta razón, en muchas campañas, se ha exportado menor volumen de vino, pero el producto ha sido de mayor calidad y precio más elevado.

Se detecta un aumento en el consumo de los vinos D.O. y en los Vinos de la Tierra sobre todo en los últimos cinco años, aunque el consumo de vino de mesa aún supone el 64% de los 1.200 millones de litros consumidos en España. Esto se traduce en un margen amplio de

actuación por parte de las bodegas y elaboradores de vinos de calidad que se enfrentan, cada vez más, a un consumidor más formado, más exigente y con mayor poder adquisitivo.

Según datos difundidos por el Comité de Gestión de Vinos de la Unión Europea, la producción de “vinos de la tierra” supone ya en España el 14 por ciento del total de vinos de mesa (vinos sin denominación de origen) producidos, con unos embotellados de casi 3,8 millones de litros en la campaña 2003-2004. La cifra, que supone un incremento de 1,5 millones de litros en dos años, se acerca algo al 39 por ciento que suponen los vinos de mesa en Italia, aunque queda todavía muy lejos de Francia, donde los “vinos de pago” suponen el 79 por ciento de los vinos de mesa.

La categoría de vinos de la tierra permite incluir en el etiquetado datos como la añada, las variedades de uva empleadas y los sistemas de elaboración, incluido el envejecimiento si lo hubiera. Se incluyen además contraetiquetas que tienen una apariencia similar a las de las denominaciones de origen, con lo que, en la práctica, se proyecta al consumidor una imagen muy parecida a la de los vinos que se embotellan bajo los criterios de un VCPRD (vino de calidad producido en una región determinada), es decir, de un vino con denominación de origen, pero sin las limitaciones que imponen las normativas de las denominaciones de origen en temas como las variedades de uva empleadas, la producción máxima autorizada de uvas por hectárea de viña o el rendimiento. Lo que supone una ventaja para luchar contra la fuerza comercial de los vinos del Nuevo Mundo, teóricamente beneficiados por la libertad en todos los estratos de la producción, sin las “limitaciones” de las denominaciones de origen.

Luego, una mayor producción de Vinos de la Tierra, junto con la mayor exigencia de calidad de los Consejos Reguladores con respecto a los productos amparados, están siendo una solución y pueden ser salidas rentables y prestigiosas de una parte importante de la producción que, desde hace varios años y sobre todo en determinadas zonas vitivinícolas, tiene serias dificultades de comercialización.

Un ejemplo bastante claro de este fenómeno lo tenemos en el marco de Jerez, zona de gran tradición vitivinícola dedicada a la elaboración de vinos generosos de gran reconocimiento y prestigio. Como se ha podido observar en las Figuras 1 y 2, a pesar del balance positivo de las exportaciones de vinos españoles en ésta última década, y teniendo en cuenta que desde el 2004 se ha producido una disminución considerable en el consumo de vino de mesa a granel, hay que resaltar el fuerte descenso del consumo de vinos de Jerez más acentuado quizás en los últimos años. Dicha tendencia negativa ha estado marcada tanto por una pérdida del volumen exportado como del valor del mismo superando el 100% en volumen y ventas en dicho periodo.

El Marco de Jerez es un sector vitivinícola de gran tradición cuyos vinos, amparados desde 1935 por su Consejo Regulador bajo la Denominación de Origen “Jerez-Xérèz-Sherry y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda”, han alcanzado gran renombre y prestigio a nivel internacional. Sin embargo, es una de las zonas de España más afectada por los nuevos cambios de mercado del Vino.

Según datos de varias campañas del Consejo Regulador, desde 1980 se ha producido un descenso continuado del 2,9% por año de ventas tanto en el mercado nacional como en el exterior (Figura 3). Este descenso se ha debido principalmente la evolución negativa del consumo de vinos generosos a nivel internacional, sobre todo del Fino y el Medium cuyas exportaciones en los últimos cinco años han alcanzado valores de -24,4% y -31,1% respectivamente.

Esta problemática situación provocó que, desde hace varios años, tanto los viticultores como los bodegueros de la zona comenzaran a buscar nuevas alternativas para dar salida a los excedentes. Como una de las soluciones, tras un diagnóstico del Sector Vitivinícola del Marco de Jerez (Julio de 2002), la Unidad de Prospectiva de la Consejería de Agricultura y Pesca propuso destinar parte de la superficie a la elaboración de otro tipo de vinos, como los vinos

de la Tierra. Ya por entonces, se estimaba que la producción de este tipo de vinos rondaba los 70.000 hL al año, sin embargo, no existía ningún reglamento a seguir por las bodegas para la elaboración de los mismos.

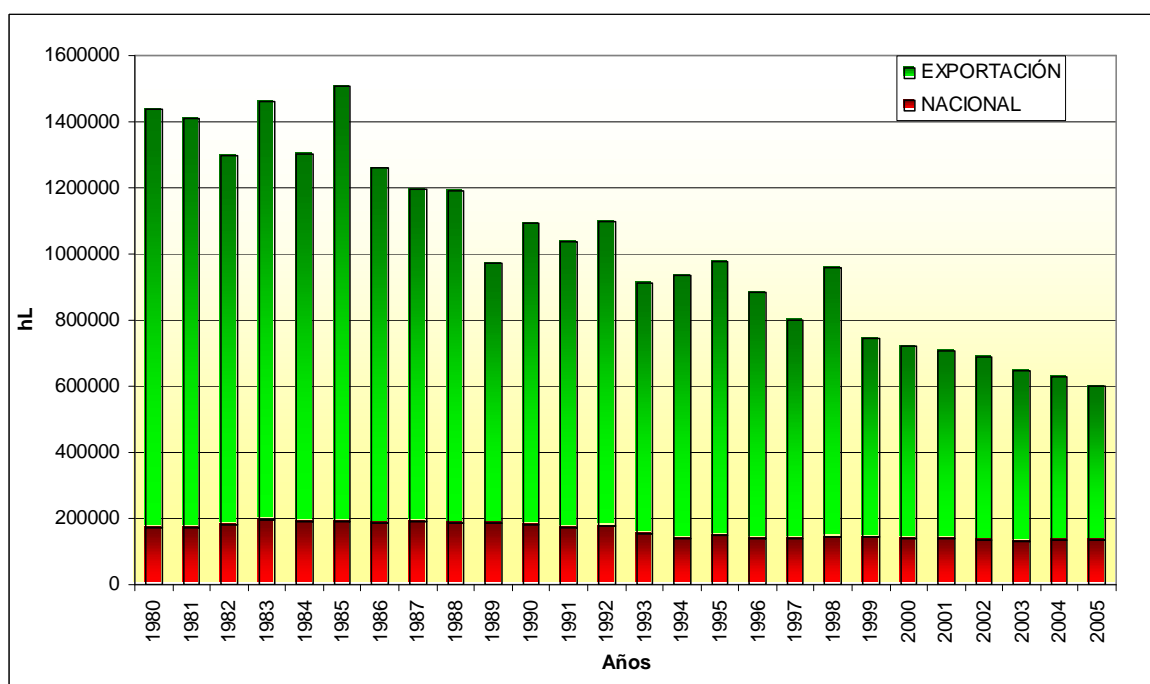


Figura 3. Evolución de ventas nacionales e internacionales en hL

Desde entonces, bodegas y cooperativas de la zona han estado trabajando para que estos vinos sean reconocidos como Vinos de la Tierra de Cádiz, elaborando asimismo un pliego de condiciones que recoge los requisitos específicos que han de cumplir dichos vinos para estar amparados por dicha mención.

Actualmente, estos vinos se encuentran entre los Vinos de la Tierra reconocidos en Andalucía según el Real Decreto 1126/2003 de 5 de septiembre por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (BOE nº228, de 23 de septiembre de 2003) y aparecen como tales en la página web de la Consejería de Agricultura y Pesca (Junta de Andalucía). Asimismo, en dicha página se puede acceder al pliego de condiciones aprobado el 19 de abril de 2005. En dicho pliego se recogen tanto las características como los requisitos de

producción, elaboración y comercialización que deben cumplir estos vinos para estar protegidos con la mención de “Vinos de la Tierra de Cádiz”.

Aunque es bastante difícil estimar el volumen de Vinos de la Tierra de Cádiz producidos en la zona en los últimos años, debido al gran número de bodegas y cooperativas que elaboran este tipo de productos y que se encuentran fuera de la D.O., según datos del Consejo Regulador, basados en las bodegas inscritas que destinan parte de su producción a dicha actividad, aproximadamente desde el año 2000 hasta 2004 el volumen de vinos de la Tierra de Cádiz se ha incrementado en un 114% (Figura 4), frente al descenso del 3,5% que ha sufrido la producción de vinos de Jerez en la misma fecha.

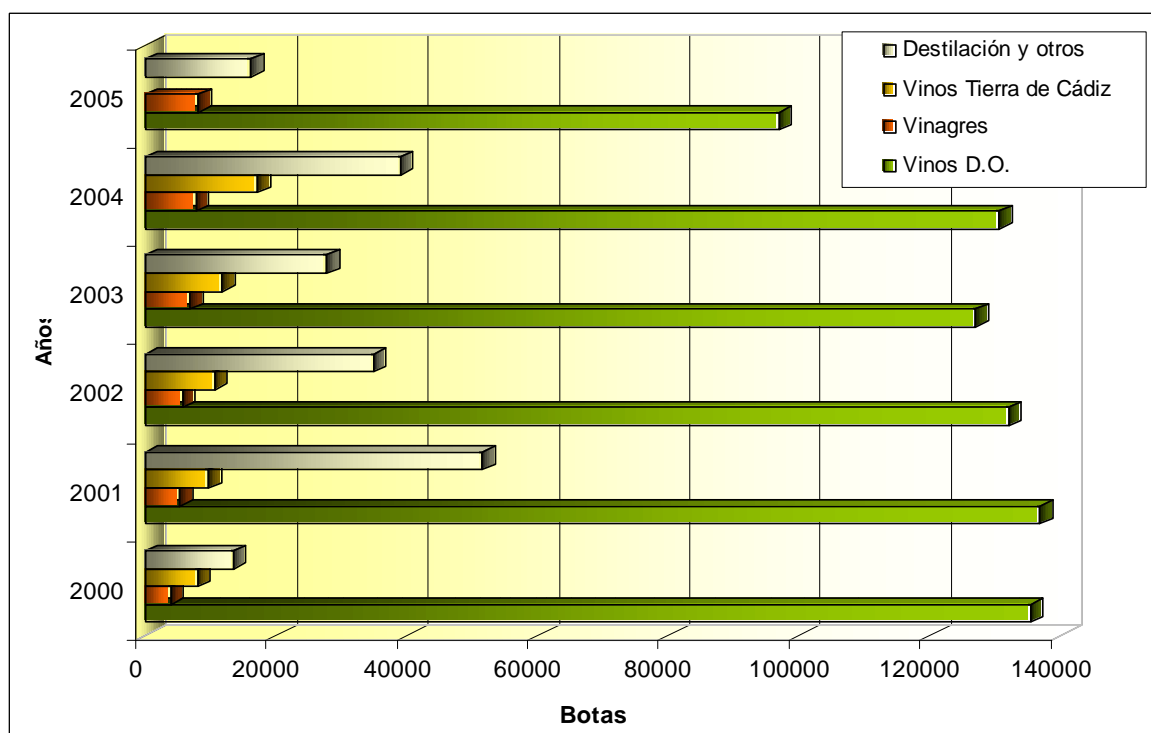


Figura 4. Datos de producción recogidos por el Consejo Regulador desde el año 2000 hasta 2005.

A pesar de ser un dato importante, la producción de dichos vinos sólo supone un 9% de la producción total frente al 67% de la producción de vinos de Jerez. Sin embargo, dicha producción junto con la del vinagre, que se ha incrementado en los últimos años en un 94% y

supone un 4% de la producción total, está siendo una buena salida a la producción de la zona. Y, aunque todavía queda mucho camino por recorrer, sobre todo en lo que a la calidad de los “Vinos de la Tierra de Cádiz” se refiere, algunos de estos vinos han alcanzado gran fama en España y empiezan a atraer la curiosidad de otros consumidores fuera de nuestras fronteras. Esto no hubiera sido posible sin la creciente inquietud de viticultores y bodegueros por nuestros productos y por la continua búsqueda de alternativas, tanto vitícolas como tecnológicas, que nos permitan la obtención de productos de más calidad y diversificar la producción vitivinícola tradicional de la zona.

III. ANTECEDENTES

III. ANTECEDENTES

III.1. INTRODUCCIÓN

La calidad de los alimentos es un concepto que viene determinado por la conjunción de distintos factores relacionados todos ellos con la aceptabilidad del mismo. Se define como el "conjunto de atributos que hacen referencia de una parte a la presentación, composición y pureza, tratamiento tecnológico y conservación que hacen del alimento algo más o menos apetecible al consumidor y por otra parte al aspecto sanitario y valor nutritivo del alimento" (www.elergomista.com).

En la práctica es preciso indicar la calidad a la que nos referimos: calidad nutritiva, calidad sanitaria, calidad tecnológica, calidad organoléptica y calidad económica. La calidad organoléptica de un alimento se define por su flavour (sabor y aroma) junto con su color y textura. El aroma de los alimentos constituye un criterio importante de calidad, ya que es uno de los factores determinantes para que un determinado producto sea aceptado por el consumidor (Horvat y col., 1990; Robertson y col., 1990).

El aroma de los alimentos es muy complejo y está formado por numerosas sustancias, sin embargo, no todas ellas producen olor, es decir, no todas llegan a la pituitaria humana en concentración suficiente como para producir olor. Para ello deben superar una concentración umbral, que es la cantidad mínima de un compuesto que puede ser directamente reconocido por su olor o sabor.

La concentración umbral no coincide con la concentración analítica y, además, depende de la tensión superficial de los compuestos, la temperatura, la composición del medio y, sobre todo, de la sensibilidad del catador. Para que se perciba un olor es necesario que la concentración analítica sea igual o superior a la concentración umbral. A esta relación entre la concentración analítica y la umbral se le denomina "valor de aroma" o "valor de actividad odorante" (VAO) y es una medida de la potencia-intensidad aromática de una sustancia

(Cacho, 2003). Los compuestos aromáticamente activos serán aquellos que tengan un valor de aroma superior a 1 (Torrens, 2000). Gracias a este valor, podemos comparar intensidades aromáticas de una misma sustancia en diferentes productos o una mezcla de odorantes en un mismo producto. Es decir, según Ferreira (1992) el valor de aroma nos permite jerarquizar la importancia de los aromas. Según Guth (1997), el concepto VAOs es esencial para cuantificar los niveles de compuestos reconocidos y establecer diferencias aromáticas entre vinos de diferente origen y variedad.

La concentración de un aroma influye no solamente en su detección o intensidad sino también en el olor percibido. Así, el trans-2-nonenal puede variar su olor desde plástico a calabaza al aumentar la concentración, y el furfuriltiol pasa de café a cebolla (Saxby, 1996; Cacho, 2003).

A los componentes particularmente responsables del aroma característico de un alimento se les denomina compuestos impacto (“character impact compound”), y según la presencia de dichas sustancias se pueden distinguir cuatro tipos de aromas (Belitz y Grosch, 1988; Riu-Aumatell, 2005):

- **Grupo I:** el aroma se debe únicamente a un solo compuesto. El resto de sustancias aromáticas sólo matizan el aroma característico que se percibe del alimento.
- **Grupo II:** el aroma típico de un alimento viene determinado por varios compuestos entre los cuales uno de ellos juega un papel principal.
- **Grupo III:** el aroma viene determinado por un gran número de compuestos que se pueden reproducir, sin que destaque ningún compuesto impacto.
- **Grupo IV:** el aroma viene determinado por un gran número de compuestos volátiles imposible de reproducir fielmente.

Al igual que en muchos otros alimentos, en los vinos, los aromas constituyen un parámetro esencial de calidad. Concretamente en el caso de los vinos blancos dicho parámetro es tan importante que incluso se pueden considerar hoy día dos grandes estilos de productos.

Por una parte, los vinos blancos secos que llamamos de “tipo varietal o cepa”, en los cuales la expresión aromática, más compleja incluye igualmente el aroma primario procedente de la uva. Y los vinos blancos secos denominados de “tipo tecnológico” que cuidan sobre todo la calidad del aroma secundario procedente de la fermentación alcohólica (Delteil y col., 2000).

El aroma del vino es de una gran complejidad resultado de una larga secuencia biológica, bioquímica y tecnológica y que se debe en parte a su origen y al número elevado de constituyentes volátiles que contiene, los cuales se van a encontrar en concentraciones que van desde algunos ng/L a algunas centenas de µg/L o algunos mg/L. Son más de 900 los compuestos volátiles que forman parte del aroma de los vinos, de los cuales se han identificado más de 200, aunque en pocos casos se conoce la relación entre la concentración de estos compuestos y las características aromáticas del vino. Estos compuestos son de dos tipos: unos de naturaleza volátil (compuestos libres) entre los que se encuentran un gran número de familias químicas como: alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos, cetonas, terpenos, etc., que generalmente están presentes en todos los vinos aunque en concentraciones diferentes; y otros compuestos inodoros, que provienen en su mayor parte de la uva y que son susceptibles de liberar moléculas olorosas bajo la influencia de diversos factores tecnológicos, biotecnológicos y fisicoquímicos (precursores del aroma). Así, en la apreciación objetiva del aroma del vino y de su evolución se ha de tener en cuenta el conjunto de estos constituyentes volátiles y precursores ya que conjuntamente constituyen el potencial aromático del vino.

Según Cacho (2003), entre la multitud de compuestos volátiles del vino sólo unos pocos, alrededor de 60, son contribuyentes del aroma, los demás prácticamente no intervienen. Sin embargo, resalta la importancia de los sinergismos y antagonismos entre estos compuestos que dan como resultado la intensificación o debilitamiento del aroma.

Aunque a la compleja composición química del aroma de un vino contribuyen cientos de compuestos, el contenido total de compuestos aromáticos es pequeño. Está comprendido entre 0,8-1,2 g/L, lo que equivale a aproximadamente al 1% de la concentración de etanol. De

ANTECEDENTES

esta cantidad, el 50% está constituido por los alcoholes superiores (1-propanol, 2-metilpropanol, 3-metilbutanol y 2-metilbutanol) que se forman durante la fermentación. La concentración de los compuestos restantes varía de 10^{-4} a 10^{-11} g/L (Valcárcel, 2006).

Asimismo, varios factores como la variedad, el clon, la madurez del fruto, la región, el clima, el suelo, las prácticas culturales, los tratamientos prefermentativos, la fermentación, la cepa de levadura, la conservación y factores accidentales (infección por *Botrytis*) pueden tener una incidencia positiva o a veces negativa sobre la calidad organoléptica del vino (Cabrera y col., 1988; Gómez-Plaza y col., 1999; Falqué y col., 2001; Gómez-Míguez y col., 2007).

Dentro de la multiplicidad de sustancias que participan en el aroma del vino se pueden distinguir cuatro grandes grupos (Schreier, 1979; Cacho, 1994):

- **Aroma primario o varietal:** proviene de la uva y depende principalmente de la variedad (Ferreira y col., 1996), aunque también de otros factores como el clima, las características de la cosecha (López-Tamames y col., 1997), la situación geográfica (Ferreira y col., 1996), estado sanitario y las técnicas de cultivo (Di Stefano y Corino, 1986; Hardie y O'Brien, 1988; Reynolds y Wardle, 1997; Bena-Txourou y col., 1999; Valcárcel, 2006). Los aromas varietales pueden encontrarse en forma libre, percibiéndose por el olfato tal y como se encuentran en la uva, o en forma combinada (precursores del aroma) que se encuentran en mayor proporción pero son inodoras. Éstas últimas pueden transformarse en aromas libres potentes en el transcurso de la elaboración de los vinos por simple ruptura de un enlace químico comunicándole al vino sus aromas característicos (Ferreira, 2001; Hidalgo, 2006).

Dentro de este grupo se encuentran los terpenos, derivados de norisoprenoides, metoxipirazinas, tioles azufrados, etc. Los terpenos (monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15)) se encuentran en forma de

aldehídos, ácidos, ésteres, hidrocarburos simples y alcoholes, siendo éstos últimos los más odorantes (Hidalgo, 2006). Su concentración varía según la variedad aromática de 500-1700 µg/L de mosto (Bayonove y col, 2000), sin embargo, en la mayor parte de las cepas de vinificación, generalmente poco aromáticas, estos constituyentes son esencialmente precursores del aroma encontrándose en forma de glicósidos en proporciones combinado/libre que pueden oscilar de 2/1 a 24/1 (Hidalgo, 2006). Los derivados norisoprenoides pertenecen a la familia de los tetraterpenos (C40) que derivan de los que poseen 9, 10, 11 y 13 átomos de carbono, siendo estos últimos los más aromáticos. Las metoxipirazinas son otros compuestos aromáticos que derivan del metabolismo de los aminoácidos siendo algunas de ellas características de determinadas variedades (Ej.: 2-metoxi-3-isobutilpirazina de *Cabernet Sauvignon*). Los tioles o compuestos azufrados, derivados de la cisteína, se encuentran en la uva en forma combinada e inodora, pero durante la fermentación se liberan por la acción de enzimas β -liasas específicas. Los ácidos grasos pueden también ser precursores de compuestos aromáticos, sobre todo el ácido linoleico y linolénico que se encuentran en la baya principalmente como fosfolípidos (65-70%), lípidos neutros (15-25%) y glicolípidos (10-15%) (Hidalgo, 2006).

- **Aroma prefermentativo:** resultante de las modificaciones que sufre la uva a lo largo de los tratamientos efectuados antes de la fermentación (estrujado, despalillado, prensado, macerado) y por reacciones químicas, químico-enzimáticas y térmicas en el mosto. Los efectos mecánicos sobre la uva conllevan a fenómenos de ruptura a nivel celular y al contacto con sistemas enzimáticos. Durante estos procesos se produce la incorporación de oxígeno al medio provocando el pardeamiento enzimático y originando compuestos que participan en el aroma prefermentativo del vino. Estos compuestos, de 6 átomos de carbono, son fundamentalmente alcoholes y aldehídos formados por la acción de enzimas de la uva (lipooxigenasas, isomerasas y alcohol deshidrogenasas) sobre los ácidos grasos

poliinsaturados (principalmente linoleico y linolénico) de ciertos lípidos de la baya. La formación de estos compuestos puede afectar a la calidad del vino puesto que dan aromas verdes, herbáceos, a veces amargos (Crouzet y col., 1984; Bayonove y col, 2000).

- **Aroma secundario o fermentativo:** son los aromas resultantes de la acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica o de la acción de las bacterias durante la fermentación maloláctica. La primera conlleva la transformación de los azúcares en alcohol y productos secundarios tales como glicerina y alcoholes superiores. La segunda implica la degradación del ácido málico de la uva en ácido láctico y es una transformación deseada en el caso de los vinos tintos, y evitada en el caso de vinos blancos frescos y afrutados. La fermentación alcohólica es la responsable de la nota vinosa que constituye la base aromática común a todos los vinos, cuyos constituyentes representan cuantitativamente la mayor parte de los constituyentes de aroma.

Con la fermentación maloláctica, además de mejorar la sensación en boca y suavizar el vino, los metabolitos bacterianos volátiles aportan al vino nuevos matices que junto con los aromas varietales ya existentes, y a los originados durante la fermentación alcohólica, conforman una nueva estructura tridimensional de los aromas vínicos tras la fermentación maloláctica. Particularmente importante es también la formación de los ésteres etílicos (lactato y succinato de etilo) que aportan al vino volumen y redondez con toques lácteos y de café, en tanto que el acetato de etilo, éster de concurrencia negativa, lo perjudica bajo el prisma aromático por su fuerte olor a pegamento. También hay que resaltar que algunos aromas fermentativos de levaduras se atenúan, como el procedente de los alcoholes superiores, amílico e isoamílico, en tanto que otros alcoholes, como *n*-propanol, 2-butanol, y *n*-hexanol suelen aumentar (Suárez-Lepe, 2003).

Los aromas fermentativos van a depender del metabolismo de las especies que toman parte en el proceso de fermentación y de las condiciones medioambientales. Desde un punto de vista cuantitativo, la levadura forma una gran parte del aroma estando éste relacionado con las características genéticas de la misma y su actividad enzimática (Ferreira, 2001). Lo mismo ocurre con las bacterias lácticas sobre las cuales el pH del medio va a ejercer gran influencia (Wibowo y col., 1985; Bayonove y col., 2000).

Según Cacho (2003), los aromas fermentativos se pueden clasificar en tres grupos: los aromas derivados del metabolismo de los aminoácidos, los aromas derivados del metabolismo de los lípidos y los procedentes del metabolismo general. El primer grupo está constituido por los acetatos de alcoholes superiores, ésteres etílicos de los isoácidos, e isoácidos y alcoholes superiores, que suponen un 20% de la contribución global del aroma. Dentro del grupo de los aromas derivados del metabolismo de los lípidos se encuentran los ácidos grasos y sus ésteres etílicos que, en conjunto, representan la mitad de las unidades de aroma de los vinos tranquilos corrientes. Por último, durante la fermentación alcohólica y también durante la fermentación maloláctica, se generan compuestos que tienen incidencia sobre el aroma pero que no se pueden agrupar por familias, es el caso de ácido acético, diacetilo y ciertos ésteres etílicos que recuerdan a los derivados lácteos.

- **Aroma post-fermentativo:** debido a las modificaciones fisicoquímicas y biológicas que sufren muchos componentes del vino a lo largo del periodo de crianza en bodega o en botella. Durante esta etapa se puede distinguir entre la crianza del vino en ausencia de oxígeno (al abrigo del aire), con un bajo potencial de oxidorreducción, y los vinos criados en condiciones oxidativas. Desaparece el aroma afrutado de los vinos jóvenes evolucionando a un aroma más complejo en el cual los ésteres y alcoholes sufren lentamente un reajuste químico

(hidrólisis/esterificación) hasta alcanzar el equilibrio; los monoterpenoles se hidrolizan y sufren modificaciones moleculares por reacciones ácido-catalizadas; aparecen compuestos norisoprenoides y otros aumentan, entre los que se encuentran el vitispirano (olor a eucalipto) y la β -damascenona (olor a rosa, flores exóticas); disminuyen los vinilfenoles (4-vinifenol, olor a caucho quemado; 4-viniguayacol, clavo, almendra tostada) y se forman pequeñas cantidades de fenoles volátiles como la vanillina y el eugenol, algunos de los cuales proceden de los glicósidos de la uva (Dugelay, 1993; Sefton y col., 1993); aumenta el sulfuro de dimetilo y los derivados furfurales (Bayonove y col., 2000).

Durante la crianza en barrica, las sustancias volátiles que se pueden extraer de la madera se difunden en el vino aportando a éste aromas característicos del tipo de madera y que participan en el aroma del producto. El origen de la madera, las condiciones de fabricación (secado, tostado) y el uso de las barricas puede influir en el tipo y cantidad de compuestos volátiles que se pueden extraer de la madera (Chatonnet y col., 1990; Francis y col., 1992A; Masson y col., 1996). Entre estos compuestos volátiles se encuentran los guayacoles, siringoles, furanos y piranos sustituidos, γ -lactonas, compuestos norisoprenoides, pirazinas y piridinas (Chatonnet y col., 1990; Sefton y col., 1990; Dubois, 1994a).

Aunque esta clasificación de los aromas del vino es la más general y la que se ha estado utilizando de forma tradicional, es indiscutible que hay aspectos del aroma del vino que son difíciles de clasificar. A veces está bastante claro que el aroma de un determinado vino procede de la uva y se clasifica como primario, como en el caso de los vinos procedentes de la variedad *Moscatel*, sin embargo, en la mayoría de las ocasiones diferentes tipo de uva originan vinos con características aromáticas diferentes, aun utilizando la misma cepa de levadura durante la fermentación. Está claro que dependiendo de la materia prima, una misma cepa de levadura podrá producir un tipo u otro de aromas, o más o menos cantidad, propios de su metabolismo y que puede revelar aromas a partir de precursores propios de la variedad. Lo mismo ocurre

con determinadas notas aromáticas que se generan durante el proceso de crianza en muchos vinos y que provienen de precursores del aroma de la uva. En ambos casos los aromas serían difíciles de situar dentro de la clasificación tradicional: primarios, secundarios o terciarios.

Surge la necesidad de clasificar los aromas utilizando otros criterios. Así, Cacho (2003) y, más tarde Riu-Aumatell (2005) proponen una clasificación de los aromas que, no sustituye a la anterior pero si la complementa. Así, distinguen cuatro categorías en función de su contribución al aroma del vino o por su capacidad de modificar el perfil aromático de un vino.

- **Aromas irrelevantes:** Engloba a la mayoría de los 900 compuestos volátiles presentes en la mayoría de los vinos. Muchos de ellos están en altas concentraciones, pero no tienen influencia alguna sobre el aroma.
- **Aromas base o constitutivos:** Formado por aromas que están en todos los vinos en concentraciones apreciables y que constituyen el tronco aromático-gustativo. Son los alcoholes de fusel y sus acetatos (isobutílico, isoamílico y feniletílico), metionol, ácidos grasos, ésteres etílicos (hexanoato y octanoato), acetaldehído, diacetilo y β - damascenona.
- **Aromas sutiles:** Formado por componentes que, estando en todos los vinos, su concentración sólo a veces supera ligeramente el valor umbral. Nunca llegan a ser aromas predominantes pero proporcionan las notas o tonos diferenciales. Si se hacen preponderantes constituyen un defecto. Ej.: guayacol, vinilguayacol, eugenol.
- **Aromas impacto:** Son aquellos cuya presencia modifica de forma sustancial el aroma del vino, o de forma sutil si varía su concentración. Sólo se encuentran en determinados vinos y su impacto sensorial es tan intenso que diferencian un vino

del resto. Ej.; linalol en vinos *Moscatel*, el óxido de nerol en *Gewürztraminer* o la 4-metil-4-mercaptopentanona en *Sauvignon blanc*, el sotolón en Jerez y Sauternes.

Según Ferreira (2001), es más útil hacer una clasificación atendiendo a la procedencia del esqueleto carbonado de la molécula de aroma (Fig. 5). Hay una serie de aromas cuyo esqueleto procede directamente de la uva, como los terpenos, los norisoprenoides, muchos fenoles volátiles o unos cuantos mercaptanos superiores derivados de la cisteína. En segundo lugar, hay una serie de familias de componentes aromáticos que están ligados a algún proceso metabólico clave de las levaduras entre las que se encuentran las familias relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos y los ésteres etílicos. Y, finalmente, algunos aromas se forman por oxidación de algunos componentes procedentes del metabolismo celular o de la lisis, como es el caso del sotolón (Ferreira y col., 2000). La otra fuente importante de los aromas es la madera que puede ceder componentes aromáticos o precursores que por reacción pueden ser la fuente de un aroma, como es el caso del furfuriltiol (Tominaga y col., 2000).

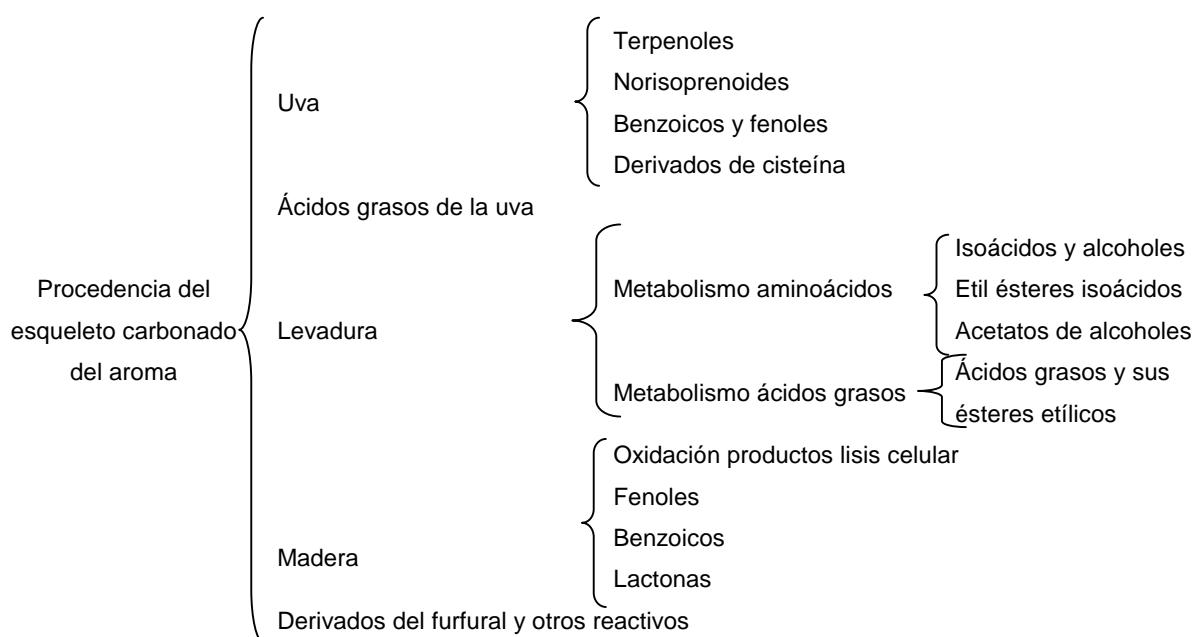


Fig. 5. Clasificación de los aromas según el esqueleto carbonado de su molécula (Ferreira, 2001)

III.2. ELABORACIÓN TRADICIONAL DE VINOS BLANCOS

De forma tradicional los vinos blancos secos se han elaborado utilizando una tecnología centrada en la obtención de vinos de óptima calidad, pero pobres en cuanto a calidad organoléptica. Sin embargo, las nuevas tendencias en los gustos del consumidor y los nuevos avances en el conocimiento y control de las operaciones tecnológicas prefermentativas, fermentativas o postfermentativas, tradicionales o no, han ampliado la gama de productos. De manera que el uso de una u otra técnica de vinificación y el momento de su aplicación dependen actualmente del tipo de vino que se desee elaborar, ya que a cada tipo de vino le corresponde una adaptación de la técnica de vinificación.

Gracias a estos avances, y basándonos nuevamente en el parámetro de los aromas como parámetro esencial de calidad de los vinos blancos, se pueden distinguir dos grandes estilos de vinos. Por una parte, los vinos de “tipo tecnológico”, que cuidan la calidad del aroma procedente de la fermentación alcohólica (aroma secundario); y por otra parte, los vinos de “tipo varietal”, que engloba además el aroma procedente de la uva (aroma primario).

Cada tipo de vinificación implica una fase clave, durante la cual, las actuaciones del enólogo repercuten irremediabilmente en el gusto y aroma del vino. El sabor del vino blanco seco, elaborado a partir de una variedad de uva determinada, depende en gran medida de las condiciones en que se desarrollan las distintas operaciones prefermentativas (vendimia, molturado, prensado y desfangado) y del desarrollo de la fermentación alcohólica. En el caso de los vinos blancos secos de “tipo tecnológico”, dentro de los cuales se incluirían los vinos blancos tradicionales, estas operaciones resultan clave para el enólogo, cuyo objetivo principal es evitar al máximo el intercambio de sustancias entre el mosto y las partes sólidas de la uva.

Las operaciones realizadas durante el proceso de elaboración de este tipo de vino se pueden clasificar como sigue:

III.2.1. FASE PREFERMENTATIVA:

2.1.1. Despalillado

La función principal del despalillado es la de separar las bayas del raspón así como de todas las partes leñosas, hojas, pedúnculos, etc. Es una práctica habitual en la elaboración de vinos blancos cuando se pretende evitar que éstos se rompan durante el molturado o prensado cediendo así compuestos de los raspones como polifenoles polimerizados con carácter astringente y sustancias con carácter aromático vegetal. El despalillado, por tanto, evita sabores astringentes, amargos, vegetales y herbáceos en los vinos al mismo tiempo que limita la oxidación de los mismos, favoreciendo el desarrollo de sensaciones en boca de redondez y de tipo carnosos (Delteil y col., 2000).

Asimismo, dicha operación disminuye el porcentaje de burbas aumentando la capacidad autofiltrante de la pasta durante el prensado. Para determinados tipos de prensas (horizontales de platos o verticales) el despalillado es esencial para obtener buenos rendimientos ya que los raspones proporcionan al hollejo cierta elasticidad y aseguran el drenaje del mosto (Peynaud, 1989) (actúan como cánulas durante el prensado facilitando el drenaje y escurrido del mosto). Asimismo, la presencia de raspones limita el contenido de los mostos en proteínas termo-inestables responsables de la degradación proteica de los vinos blancos (Riberéau-Gayón y col., 2003).

2.1.2. Estrujado o molturado

Consiste en romper la uva para liberar el mosto de las células de la pulpa. Se realiza en una molturadora, haciendo pasar la uva entre dos cilindros muy próximos y que giran en sentido contrario. Según Riberéau-Gayón y col. (2003), se le atribuye la propiedad de favorecer la difusión de los constituyentes odorantes de la película de los mostos, aunque el mosto se libera rápidamente impidiendo el contacto con el hollejo.

La ventaja del estrujado consiste en la gran rapidez con que se separa el mosto y exige menos volumen en las prensas. Cuando no se realiza el estrujado, el mosto contiene menos fangos y tiende menos a la oxidación (Peynaud, 1989). Por ello, cuando se aplica debe realizarse con intensidad moderada con el fin de no triturar totalmente la uva y evitar dañar o romper las pepitas, ya que puede entrañar cierto número de efectos negativos que se desarrollan posteriormente (degradación de aromas, aumento de fangos, etc) (Delteil y col., 2000).

Antes de un prensado inmediato, el molturado aumenta el escurrido de la vendimia entre un 30 y un 50% durante el llenado de la prensa y se reduce el tiempo de prensado (Riberéau-Gayón y col., 2003).

2.1.3. Escurrido

Consiste en la separación del mosto liberado por el estrujado. Si es estático (escurrido en tolva, autovaciantes, escurrido espontáneo durante el llenado de la prensa) o dinámico (tipo desvinador), debe ser rápido para limitar la intensidad de los fenómenos de maceración y oxidación (Delteil y col., 2000).

En el primer caso, los mostos presentan niveles de turbidez de aproximadamente 500 NTU y un porcentaje de fangos inferior al 10%. El escurrido dinámico tiene el inconveniente de producir mostos con altos niveles de turbidez comprendidos entre 1000 y 10000 NTU y un alto porcentaje de fangos (30 y 50%) (Riberéau-Gayón y col., 2003), lo cual no es interesante desde el punto de vista de la calidad en vinos blancos.

2.1.4. Prensado

El prensado tiene gran importancia sobre el tipo de vino. Es la operación cuyo objetivo es la extracción de mosto por efecto de la presión. Durante el prensado se obtienen distintas fracciones de mostos que difieren en su composición química, como por ejemplo en compuestos fenólicos, las tasas de fangos, pH, acidez, etc. Luego, la calidad del mosto dependerá del tipo de prensa y del modo operativo empleado. Cuanto mayor es la presión efectuada, mayor es la extracción mecánica de las sustancias procedentes del hollejo (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de mostos procedentes de varios sistemas de obtención
(Peynaud, 1989)

| PRENSADO SIN ESTRUJADO | | MOSTO DE ESTRUJADO | ESTRUJADO | |
|---------------------------------|------|-----------------------|----------------------------------|-------------|
| | | | PRENSADO CONTINUO 1ª FRACCIÓN | 2ª FRACCIÓN |
| Acidez total | 4,22 | 4,51 | 3,83 | 3,14 |
| pH | 3,08 | 3,02 | 3,20 | 3,92 |
| Alcalinidad en cenizas (meq) | 41,5 | 34,5 | 39,0 | 98,0 |
| Taninos (mg) | 50 | 20 | 100 | 800 |
| Hierro (mg) | 2 | 1 | 3 | 20 |

Según Aleixandre y García (1993), un mosto de alta calidad se obtiene por extracciones progresivas con un lento incremento de la presión, evitando roturas de las partes sólidas de los racimos, limitando la actividad enzimática oxidativa y en muchos casos permitiendo la filtración del mosto a través del orujo. Los parámetros indicativos de calidad de dicho mosto serían, según Darías-Martín y al. (2004), un valor de turbidez comprendido entre 50 y 150 NTU y densidad óptica a 420 nm bajo e índice de polifenoles (280 nm) < 10. Además, deben tener un pH y acidez total apropiados para la elaboración de vinos blancos.

Para mantener la calidad de los mostos y, como consecuencia, de los vinos lo más aconsejable es realizar una presión de intensidad débil, limitar los removidos y seleccionar

rigurosamente los mostos obtenidos (Terrier y Blouin, 1975). Normalmente se utilizan tres tipos de prensas discontinuas: las prensas verticales, las horizontales de platos y las neumáticas, siendo estas últimas las más utilizadas por la calidad de los mostos extraídos (Asselin y Delteil, 2000) y las numerosas ventajas que ofrece como menor cantidad de fangos o burbas (< 5%) y, por lo tanto, menor turbidez y menor tiempo de prensado (Riberéau-Gayón y col., 2003).

2.1.5. Correcciones prefermentativas

En zonas de clima cálido es una práctica habitual la acidificación del mosto; con ello se consigue elaborar vinos más equilibrados y favorecer su buena evolución biológica y conservación. Generalmente se realiza cuando el pH del mosto es superior a 3,7 ya que es conveniente reducir el pH para evitar contaminaciones bacterianas y, además, mantener la frescura del vino. Por otra parte, un pH bajo aumenta la capacidad antiséptica del sulfuroso (Schaeffer y col., 2000)

La acidificación se realiza por adición de ácido tartárico hasta aproximadamente el pH deseado teniendo en cuenta siempre la acidez del mosto y no superando los límites establecidos por la reglamentación CEE 822/87 (1,5 g/L de ácido tartárico).

Posteriormente se realiza el sulfitado del mosto con una triple finalidad: proteger al mosto frente a oxidaciones (antioxidante), seleccionar el medio fermentativo (antioxidasa) y, sobre todo, facilitar el desfangado estático del mosto, ya que tiene un efecto destructivo (degradante) sobre las células del hollejo que ceden compuestos solubles. La dosis empleada depende del grado de maduración, el estado sanitario de la vendimia, el pH del mosto, la temperatura y los riesgos de contaminación además del tipo de vinificación y las características del mosto. Para la elaboración de vinos blancos las dosis varían de 50 a 100 mg/L dependiendo de la presencia o no de pudrición, aunque es conveniente evitar dosis superiores

a los 50 mg/L ya que pueden originar olores de reducción en el vino tras el sulfitado final (>40 mg/L).

Una de las últimas novedades en este sentido es el empleo de un coadyuvante enológico que contiene dióxido de azufre y ácido ascórbico oportunamente tamponado, estudiado para favorecer la reducción del oxígeno en los mostos y en los vinos. Numerosos estudios han demostrado que el sinergismo entre las dos moléculas activas inhibe los fenómenos oxidativos ya sea de naturaleza enzimática como química. La presencia de ácido ascórbico garantiza que el oxígeno sea eliminado en tiempo breve, mientras el mismo vino consigue su potencial redox límite, premisa necesaria para evitar los fenómenos oxidativos y para desarrollar el bouquet deseado. Ensayos prolongados han demostrado que después de un tratamiento con este preparado los vinos que contienen hasta 8 ppm de oxígeno disminuyen a niveles iguales a cero después de 36 horas. Se incrementan los aromas primarios de variedades como *Sauvignon Blanc*, *Gewürztraminer*, *Moscatel* y otras variedades aromáticas. Además, según Bertrand y de Revel (1998), con el empleo de este tipo de coadyuvante se realza la intensidad y frescura aromática de los vinos.

2.1.6. Desfangado

Consiste en la eliminación más o menos importante de las materias sólidas (fangos), que se encuentran en suspensión. Los vinos procedentes de un mosto desfangado ofrece ventajas de frescura, de acidez, de ligereza y su aroma es más puro, está más estabilizado frente a las oxidaciones (Peynaud, 1989).

El efecto favorable del desfangado se pone de manifiesto por la calidad organoléptica de los vinos obtenidos a partir de mostos desfangados, principalmente en el carácter aromático (Ribereau-Gayón y col., 1975; Varela y col., 1999). La eliminación de los sólidos de la uva del mosto realza la producción de ésteres y limita la liberación de alcoholes de fusel durante la fermentación alcohólica, dando lugar a un incremento de la calidad aromática del

vino (Singleton y col., 1975; Klingshirn y col., 1987; Bertrand y col., 1987; Liu y col., 1987; Bayonove y col., 1995).

Los mostos desfangados favorecen la formación de acetatos de alcoholes superiores y ésteres etílicos de ácidos grasos los cuales juegan un papel positivo sobre el aroma, ya que las levaduras necesitan sintetizar lípidos que no encuentran en el mosto desfangado. Por otra parte, tal y como se puede observar en la Tabla 3, disminuye la formación de alcoholes superiores y ácidos grasos volátiles que juegan un papel negativo en el aroma. (Delteil y col., 2000). Asimismo, los vinos obtenidos a partir de mostos desfangados son más estables, sobre todo frente a fenómenos oxidativos (Varela y col., 1999).

Según Ribéréau-Gayón y col. (2003), los vinos elaborados a partir de mostos no desfangados o con demasiados sólidos en suspensión tienen aromas pesados, herbáceos y sabor amargo, presentan más color, son más ricos en compuestos fenólicos y su color es menos estable a la oxidación. Presentan frecuentemente defectos olfativos de reducción.

Tabla 3. Incidencia del desfangado de los mostos sobre los contenidos en sustancias volátiles de los vinos (Bertrand, 1981; Delteil y al, 2000)

| | NO DESFANGADOS | DESFANGADOS |
|-----------------------------------|----------------|-------------|
| Alcoholes superiores | 360 | 209 |
| 1-Hexanol | 1,42 | 0,73 |
| Acetatos de alcoholes superiores | 1,69 | 4,39 |
| Ésteres etílicos de ácidos grasos | 1,56 | 2,80 |

Por otra parte, sin embargo, un desfangado excesivo con valores de turbidez inferiores a 50 NTU, provocan un empobrecimiento del aroma afrutado de los vinos blancos secos (Ribéréau-Gayón y col., 2003). Asimismo, tiene una incidencia negativa sobre el proceso fermentativo ya que conlleva a un empobrecimiento químico y microbiológico de los mostos originando problemas de arranque tardío, ralentización y parada de fermentación (Feuillat, 1995), y un incremento del ácido acético relacionado con la limpidez del mosto clarificado

(Gracia, 1996). Los fangos finos fijan metabolitos tóxicos para la levadura, en ausencia de dichos fangos, se fijan en la pared celular frenando los intercambios de sustratos y productos del metabolismo disminuyendo el crecimiento y la actividad de las levaduras.

Según Rodríguez y col. (1999), el desfangado estático disminuye en un 11% el contenido en potasio, un 25% el contenido en calcio y un 46% el contenido en hierro, lo que puede tener serias repercusiones sobre la estabilidad del vino ya que todos estos cationes intervienen en las precipitaciones y procesos de oxidación-reducción que pueden alterar la conservación del vino.

Por otra parte, Varela y al. (1999) afirman que el desfangado reduce la población de levaduras presentes en el mosto, disminuye considerablemente la composición de ácidos grasos y provoca un aumento en la duración de la fermentación, variando dichos factores en función del tipo de desfangado aplicado (Fig. 6). No existe un valor general de turbidez óptima para los mostos decantados; se considera que el desfangado ha de conseguir una turbidez comprendida entre 50 y 200 NTU (Dubourdieu y Ollivier, 1989).

Tal y como señalan Delteil y col. (2000), se pueden utilizar diversas técnicas de desfangado. La más utilizada es el desfangado estático a baja temperatura tras un ligero sulfitado para prevenir el comienzo de la fermentación. Sin embargo, para mejorar la rapidez y la calidad de la operación obteniendo mayores rendimientos, se ha puesto en práctica actualmente la adición de extractos enzimáticos con actividad pectinasas (dosis 0,5-4 g/hL) y medios dinámicos como la centrifugación, la filtración (filtro rotatorio a vacío), o la flotación, que asegura la eliminación de los fangos hacia la parte superior de la cuba a clarificar gracias a un flujo ascendente de finas burbujas de aire o de nitrógeno.

La adición de enzimas pectinasas reduce el tiempo requerido para la caída de los sólidos y ayuda a eliminar sustancias pécticas. Los extractos enzimáticos se añaden inmediatamente después de la prensa o en la cuba de desfangado antes del relleno. La

hidrólisis de las pectinas tiene como efecto principal disminuir la viscosidad del zumo y destruir el poder “coloide protector” de las sustancias pécticas. De este modo el tamaño de las partículas del mosto aumenta después de su aglomeración. Estos dos fenómenos tienen como efecto aumentar la velocidad de sedimentación de las partículas y reducir el tiempo de clarificación.

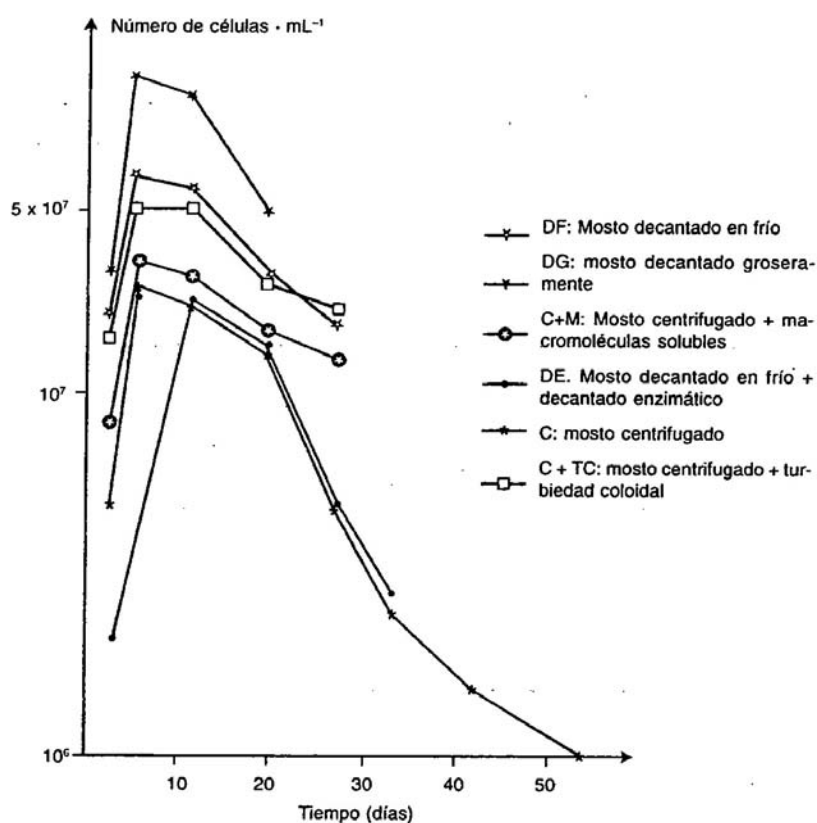


Fig. 6. Incidencia de la turbidez de los mostos sobre poblaciones de levaduras durante la fermentación alcohólica (Ollivier y col., 1987; Delteil y col., 2000)

La incidencia en la reducción del tiempo total de desfangado puede ser considerable. Generalmente, el desfangado después de la adición de enzimas no supera las diez horas. La

ANTECEDENTES

eliminación más completa del fango permite limitar considerablemente la formación de compuestos C_6 que dan un gusto herbáceo al vino.

En algunos casos se sugiere la adición de bentonita en dosis entre 50 a 100 g/hL para eliminar el exceso de proteínas que son susceptibles de provocar turbidez por quiebra proteica (Delteil y col., 2000). Aplicada al mosto antes de la fermentación ofrece numerosas ventajas: menos manipulaciones y menos fatiga del vino final, sedimentación de la bentonita tras la fermentación sin un aumento considerable de las lías, mejora de la clarificación espontánea, fijación parcial de la polifenoloxidasa, decoloración y mayor pureza gustativa (Peynaud, 1989). Sin embargo, esta dosificación de bentonita puede tener un efecto negativo sobre la componente aromática varietal de los vinos (Bayonove y col., 1995). Según Ledoux y Dubordieu (1994), al eliminar gran parte de las proteínas, el vino pierde estructura y untuosidad; además, la bentonita afecta el aroma del vino, bien por absorción directa (Guillou y col., 1998) o indirectamente al eliminar proteínas fijadoras de aromas (Lubbers y col., 1996).

También se emplean otros agentes como caseína, sílica gel, carbón activo y gelatina para eliminar compuestos ligeramente solubles como los coloides. Estos agentes poseen una carga contraria a los coloides presentes en el mosto de uva, permitiéndoles su unión y posterior precipitación, durante la cual se adsorben otras partículas insolubles. El carbón, la gelatina y la sílica gel reducen también el contenido en polifenoles (Gorinstein y col., 1984). Estudios realizados por Puig-Deu y col. (1999) ponen de manifiesto que el empleo combinado de bentonita con caseinato potásico y celulosa microcristalina conduce a fermentaciones más completas y a vinos con menos tendencia al pardeamiento, mayor estabilidad de espuma, menores contenidos en nitrógeno, polifenoles y algunos compuestos volátiles que los vinos tratados únicamente con bentonita y con un perfil aromático diferente pero que no afecta a la calidad del vino.

Estos métodos clarificantes del mosto, además de requerir de varias horas, implican la separación posterior del mosto de las burbas y afectan al contenido de compuestos

glicosilados del mosto disminuyendo la cantidad de precursores aromáticos de la uva (Moio y col., 2004). En muchas ocasiones se prefieren métodos más rápidos como la centrifugación y flotación que, además, permiten un trabajo en continuo. Sin embargo, estos métodos también presentan ciertos inconvenientes, como la oxidación de los mostos, en el caso de la centrifugación, o una pérdida excesiva de nutrientes cuando se aplica la filtración.

Según Moio y col. (2004), existe una correlación positiva entre la intensidad del desfangado y el contenido de compuestos glicosilados del mosto de manera que éste es mayor cuando el desfangado es espontáneo y va disminuyendo a medida que aumenta la intensidad de operación (desfangado espontáneo con adición de enzimas > filtración del anterior > desfangado con bentonita o caseína > desfangado con sílica gel y carbón vegetal > el anterior más filtración), con lo cual normalmente se recurre a un prensado neumático bien conducido y posterior decantado ligero (Riberéau-Gayón y col., 2003).

III.2.2. FASE DE FERMENTACIÓN

2.2.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es la fase central más importante de las fermentaciones vínicas tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo. Durante el desarrollo de la misma, a través de numerosas reacciones metabólicas, el agente microbiano produce una gran cantidad de metabolitos. Dichos metabolitos van a constituir la estructura del vino y van a ser en gran parte responsables de las características organolépticas de los mismos.

Los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica, las levaduras, tienen dos cometidos básicos; por una parte, la formación de alcohol y por otra, influir significativamente sobre las características sensoriales y la calidad de los vinos (color, aroma, gusto) (Balcones y col., 1996).

Es de vital importancia, por tanto, realizar un control de la fermentación para que ésta se desarrolle de manera óptima. El control industrial de la fermentación alcohólica exige un conocimiento exhaustivo de la cinética fermentativa, para poder dirigir su desarrollo hacia el producto deseado en las condiciones del óptimo económico. Según Delteil y col. (2000) la optimización del proceso se consigue con un buen arranque, un buen desarrollo y un buen seguimiento de la fermentación. Cualquier desviación durante la misma puede producir alteraciones en la calidad de los productos.

Un buen arranque de la fermentación implica una fuerte población de levaduras viables, bien adaptadas a las características de los mostos y a las condiciones de fermentación así como una buena fuente de nutrientes. Tradicionalmente se utilizaban los llamados “pie de cuba” para el arranque de la fermentación, que consistían en sembrar las primeras cubas a razón de 2 a 5%, con un fermento preparado algunos días antes mediante fermentación espontánea de un mosto fuertemente sulfitado (10 g/hL). Así se eliminaban las levaduras poco fermentativas y se favorecía el crecimiento de las levaduras de vinificación más resistentes. Sin embargo, los resultados de la fermentación espontánea eran bastante aleatorios lo que condujo a aislar y seleccionar determinadas cepas de levaduras a partir de fermentaciones espontáneas, lo cual dio excelentes resultados (Riberéau-Gayón y col., 2003).

El uso de cepas seleccionadas ha conducido al empleo, desde hace unos veinte años, de las llamadas levaduras secas activas (LSA); cepas seleccionadas de una manera más o menos empírica en diferentes regiones vitícolas del mundo y que presentan ciertas aptitudes enológicas. El uso de levaduras secas activas (LSA) permite al enólogo disponer de una población viable muy elevada desde el comienzo de la fermentación y mejorar el control de la calidad organoléptica que ofrece la flora microbiana en ausencia de posibles alteraciones.

Por otra parte, un buen desarrollo de la fermentación alcohólica debe conducir, por una parte, al agotamiento completo del medio en azúcares fermentables; y por otra, a la obtención de un aroma fermentativo de calidad óptima, factor de calidad particularmente

importante en los vinos blancos secos de tipo tecnológico. En dicho factor de calidad va a tener gran importancia la cepa de levadura usada y sus condiciones de desarrollo. Las cepas más alcohógenas, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. bayanus*, son las que sintetizan mayores cantidades de ésteres superiores (Soufleros y Bertrand, 1979; Bertrand, 1981), y juegan un papel positivo en la calidad del aroma secundario. Por otra parte, algunos autores (Delteil y col., 2000), han puesto en evidencia la acción de las levaduras sobre el aroma primario procedente de la uva, algunos de cuyos precursores se revelan olfativamente durante el transcurso de la fermentación.

Cuando los mostos son bastante neutros, se tiende a elegir cepas que produzcan menos alcoholes superiores (impacto negativo en el aroma) y menos acetatos de alcoholes superiores y ésteres etílicos de ácidos grasos, aportando así aromas más dulces y más especiados. Con estos aromas los vinos adquieren notas del tipo fruta confitada (Delteil y col., 2000).

En vinificación en blanco seco, la obtención de un aroma fermentativo armonioso e intenso implica que el mosto esté correctamente desfangado y que la fermentación se efectúe a una temperatura suficientemente baja. La temperatura de fermentación influye sobre la formación de compuestos secundarios y, por lo tanto, sobre la composición y calidad del vino (Aleixandre, 1991). Según Bisson y col. (1980), la temperatura no debe superar los 20°C; para optimizar la calidad del aroma fermentativo es importante manejar la fermentación a baja temperatura. Novo y col. (1999) afirman que el rendimiento en la producción de etanol es mayor a bajas temperaturas, mientras que el contenido en glicerol y acético es menor. Llauradó y col. (2002), también señalan que las fermentaciones a bajas temperaturas conducen a vinos con niveles más bajos de ácido acético observando igualmente una disminución en los contenidos de acetaldehído y acetato de etilo, lo que consideran como positivo.

Una temperatura de fermentación baja implica un aumento de los productos secundarios favorables a la calidad del vino blanco y responsables de una mejora de sus

cualidades organolépticas. Dentro del intervalo comprendido entre 15-20°C, según unos perfiles que pueden ser variables, las levaduras forman menos alcoholes superiores y más acetatos de alcoholes superiores y ésteres etílicos de ácidos grasos, cuyos aromas florales y afrutados intervienen de forma agradable en el aroma secundario de los vinos blancos. Aleixandre (1991) sitúa la temperatura óptima para el desarrollo de fermentación en valores de 17 a 18°C.

Según Usseglio-Tomasset (1998), la producción de compuestos volátiles durante la fermentación depende cuantitativamente de la especie, sin embargo, existe una gran variabilidad dentro de la misma especie y, a su vez, una gran variabilidad dentro de una misma cepa, obteniéndose resultados diferentes bajo las mismas condiciones de temperatura y sustrato (Tabla 4).

Por otra parte, distintas cepas de levadura producen diferentes compuestos volátiles. Así, según Di Stéfano (1981), en el caso del género *Saccharomyces*, las cepas *S. cerevisiae* y *S. italicus* son buenas productoras de ésteres y de ácidos grasos; *S. bayanus* produce elevadas cantidades de acetato de etilo y cantidades moderadas de ésteres y de ácidos grasos, *S. uvarum* produce elevadas cantidades de 2-feniletanol y buenas cantidades de ésteres y *S. rosei* produce 3-etoxi-1-propanol y cantidades elevadas de ácido cáprico.

Luego, actualmente, sobre todo en el caso de variedades aromáticas, no es necesario que las fermentaciones se lleven a cabo a 18°C o menos para resaltar el carácter afrutado de los vinos. En estos casos juegan también un papel importante las operaciones prefermentativas y la elección de la cepa de levadura (Riberéau-Gayón y col., 2003).

Así, por ejemplo, Suárez-Lepe (2002), recomienda no utilizar una única cepa durante la fermentación para obtener buenos perfiles aromáticos, sino que apuesta por la tecnología del cultivo mixto.

Tabla 4. Influencia de la temperatura y variabilidad de la cepa en la producción de compuestos volátiles durante la fermentación (Usseglio-Tomasset, 1998)

| | Fermentación a 15°C | | | Fermentación a 25°C | | |
|--------------------------------|---------------------|----------------|------------------|---------------------|----------------|------------------|
| | Media (n=5) | Desv máx. % | C.V. % P=0,95 | Media (n=5) | Desv máx. % | C.V. % P=0,95 |
| Acetato de isobutilo (µg/L) | 23,2 | 155,6 | 49,0 | 50,8 | 206,6 | 67,8 |
| Butirato de etilo (µg/L) | 247,0 | 163,8 | 52,0 | 150,4 | 183,8 | 59,8 |
| Acetato de isoamilo (µg/L) | 887,4 | 159,4 | 54,1 | 645,8 | 131,6 | 43,5 |
| Caproato de etilo (µg/L) | 796,8 | 144,8 | 38,3 | 595,6 | 127,3 | 30,9 |
| Lactato de etilo (µg/L) | 2641,2 | 145,4 | 41,1 | 7470,4 | 125,9 | 25,5 |
| Caprilato de etilo (µg/L) | 1086,6 | 120,9 | 24,3 | 784,0 | 148,8 | 46,4 |
| Caprato de etilo (µg/L) | 423,8 | 161,2 | 49,9 | 377,8 | 174,3 | 63,7 |
| Acetato de 2-feniletilo (µg/L) | 88,6 | 133,7 | 34 | 159,0 | 129,1 | 26,4 |
| 2-feniletanol (µg/L) | 8005,4 | 120,4 | 19,3 | 14614,0 | 11,1 | 12,5 |
| Dietilmalato (µg/L) | 254,4 | 254,4 | 30,1 | 604,8 | 146,7 | 39,1 |
| 1-propanol (mg/L) | 10,73 | 10,73 | 22,1 | 13,98 | 133,6 | 30,1 |
| Acetato de etilo (mg/L) | 28,06 | 28,06 | 81,0 | 54,56 | 147,4 | 44,6 |
| 2-metil-1-propanol (mg/L) | 12,02 | 12,02 | 24,7 | 39,24 | 115,5 | 15,2 |
| 2-metil-1-butanol (mg/L) | 9,62 | 9,62 | 35,1 | 13,66 | 125,6 | 24,9 |
| 3-metil-1-butanol (mg/L) | 52,16 | 52,16 | 19,8 | 72,04 | 110,9 | 12,2 |

Por último, no hay que olvidar que durante la fermentación alcohólica es indispensable realizar un seguimiento y control, que consiste en determinar la evolución de los siguientes parámetros: densidad, temperatura del mosto, acidez volátil en caso de parada o ralentizado, y azúcares residuales al final de la fermentación (Delteil y col., 2000).

2.2.2. Fermentación maloláctica (opcional)

La fermentación maloláctica es necesaria para la crianza y envejecimiento de los vinos tintos, sin embargo, su aplicación en vinos blancos es muy puntual. Se suele realizar en ciertos vinos blancos, sobre todo si son demasiado ácidos ya que así se suavizan biológicamente. Durante la fermentación las bacterias utilizan como principal sustrato el ácido málico, que

ANTECEDENTES

transforman a ácido láctico, pero también metabolizan el ácido cítrico y trazas de pentosas y hexosas (Davis y col., 1985). De esta manera, la actividad bacteriana disminuye la acidez del vino, realzando su aroma y complejidad por la producción de metabolitos adicionales, y aumentando su estabilidad microbiológica por eliminación de nutrientes residuales y por la producción de bacteriocinas (Fleet, 2003).

Existen pocos estudios sobre la influencia de la fermentación maloláctica sobre los aromas y, además, la influencia de ésta sobre la contribución aromática varía según los autores (Davis y col., 1985). Así, según Sauvageot y Vivier (1997), el impacto de la fermentación maloláctica sobre el perfil gustativo de vinos *Chardonnay* y *Pinot noir* es muy bajo. De Revel y col. (1999 y 2000) señalan que, desde el punto de vista aromático, los vinos blancos de *Sauvignon*, tras la fermentación maloláctica en barrica, presentan menos aromas varietales y características aromáticas más complejas descritas por los términos de ahumado, tostado y en menor grado por vainilla, especiado y a mantequilla. Sin embargo, resaltan también la importancia de algunas condiciones de fermentación, como el inóculo bacteriano empleado y el uso o no de barricas, sobre las características del producto resultante.

Luego, en términos generales, tras la fermentación maloláctica los vinos pueden alcanzar mayor redondez y cuerpo, sin embargo, disminuye el carácter afrutado y pueden aparecer ciertas desviaciones organolépticas como olores demasiado lácticos o a mantequilla (Fauvet y Guittard, 2000).

Si se desea la fermentación maloláctica se deben buscar las condiciones favorables: ausencia de azúcares residuales, temperatura de 16-20°C y concentración de sulfuroso inferior a 60 mg/L (Fauvet y Guittard, 2000).

III.2.3. FASE POSTFERMENTATIVA

2.3.1. Clarificación y conservación

Una vez terminada la fermentación alcohólica es necesario clarificar y estabilizar el vino con respecto a posibles alteraciones de la limpidez y microbiológicas, ya que el consumidor exige vinos brillantes y con ausencia de alteración microbiológica como parámetro de calidad.

La clarificación o deslío se realiza normalmente de forma natural manteniendo al vino, una vez finalizada la fermentación a baja temperatura. Para acelerar el proceso, en muchas ocasiones se realiza un “encolado” o centrifugado.

El encolado consiste en disminuir la turbidez e inestabilidad de los vinos mediante la adición de sustancias que favorezcan la floculación o sedimentación de las partículas en suspensión (Caillet, 1994). En vinos blancos las colas que más se utilizan son las gelatinas, las caseínas y caseinatos, la cola de pescado y las bentonitas solas o con encolado mixto. Sin embargo, es muy importante controlar el tipo de cola y la dosis a utilizar ya que puede tener serias repercusiones sobre las características del producto final. El enólogo debe utilizar la cola que mejor se adapte a la clarificación y estabilización del vino y evaluar mediante análisis sensorial la cola más apropiada a la calidad del producto final, ya que el uso excesivo de colas puede suprimir muchos aromas (Escudier y col., 2000).

La centrifugación tiene como finalidad acelerar la caída de los sedimentos y provocar una decantación rápida. Además permite la eliminación de las levaduras (99,8%) y lías de un vino joven asegurando su conservación. Sin embargo, es ineficaz a la hora de eliminar pequeñas partículas por lo que no es capaz de proporcionar el abrillantado que da la filtración (Peynaud, 1989).

Una vez separado el vino de sus lías (trasiego), éste se sulfita para mantener su acidez y su frescura. La concentración de sulfuroso libre debe estar entre 20-30 mg/L para evitar su oxidación durante el almacenamiento, aunque es necesario verificar y ajustar dicha concentración periódicamente (Delteil y col., 2000). Por otra parte, se puede reemplazar el aire de la superficie del vino por un gas o mezcla de gases neutros (nitrógeno-carbónico) (Riberéau-Gayón, 1981; Macheix y col., 1991; Escudier y col., 2000), aunque, en cualquier caso, resulta indispensable el sulfitado.

La estabilización tiene como objetivo conservar la limpidez de los vinos y evitar posibles desviaciones durante su conservación. Los enturbiamientos de los vinos se pueden deber tanto a una infección microbiana como a la insolubilización de sustancias en exceso bajo determinadas circunstancias. Es una etapa complementaria a la clarificación y, por tanto, todos los vinos deben someterse a ambas operaciones.

Uno de los principales problemas de los vinos blancos jóvenes es la precipitación de sales del ácido tartárico en forma de cristales, lo cual tiene importantes repercusiones, sobre todo, en el vino una vez embotellado y durante el transporte (Escudier y col., 2000).

La técnica más utilizada es la estabilización por frío consistente en provocar de forma preventiva una cristalización para eliminar los elementos en sobresaturación inestables a corto plazo en las condiciones normales de uso. Para ello, el vino se refrigera a una temperatura próxima a su punto de congelación y se almacena en depósitos isotermos durante un periodo de una semana (Gómez y col., 2003). El frío no ejerce una acción química y tampoco consigue la estabilización microbiana de los vinos; sólo produce transformaciones físicas y, sobre todo, provoca insolubilizaciones (Peynaud, 1989).

Posteriormente a la estabilización los vinos se someten a un proceso de filtración en el cual se eliminarán tanto partículas en suspensión, no eliminadas durante la clarificación y

estabilización, como microorganismos. Normalmente este proceso se lleva a cabo en tres etapas; en primer lugar, se realiza una filtración de desbaste alcanzándose un nivel de turbidez de 1 NTU; posteriormente se realiza una filtración sobre placas; y por último, se lleva a cabo una filtración sobre membranas previa al embotellado para obtener la esterilidad del producto (menos 1 germen/botella). Si la filtración se realiza tras el encolado se asegura la limpidez y estabilización de los vinos en un breve periodo de tiempo. Ambos procesos son complementarios ya que el filtrado clarifica más rápidamente y de forma más segura los vinos jóvenes y el encolado aumenta la duración de la limpidez (Peynaud, 1989).

Para una conservación óptima de la calidad también es importante que el vino se mantenga a una temperatura moderada, del orden de 10-12°C. A temperaturas excesivas se produce una degradación del aroma primario y secundario principalmente (Usseglio-Tomasset, 1983; Delteil y col., 2000).

III.3. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO DE AROMAS

Cuando lo que se pretende es elaborar vinos aromáticos con características afrutadas y/o florales resaltando la originalidad y la tipicidad del vino, el enólogo debe favorecer la expresión aromática de la cepa de origen.

La elaboración de este tipo de vinos, denominados “varietales”, se realiza de forma idéntica a la de los vinos blancos secos de tipo tecnológico. Sin embargo, se añaden otras operaciones con la finalidad de extraer la fracción aromática, tanto libre como combinada de la uva, o liberar los precursores del aroma. Dichas operaciones se pueden clasificar en dos grupos. El primero consiste en la extracción, mediante métodos físicos, de los compuestos aromáticos, volátiles y precursores del aroma, presentes en el hollejo; el segundo consiste en transformar la fracción del aroma combinado en libre.

III.3.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

3.1.1. Maceración pelicular

La maceración pelicular es un proceso prefermentativo mediante el cual se favorece el contacto entre el hollejo y el mosto de uva bajo condiciones controladas (temperatura y tiempo). El objetivo de la maceración pelicular es extraer el potencial aromático de la uva aumentando así la calidad del producto

Según Hidalgo (2006), el potencial aromático de la uva se encuentra mayoritariamente en el hollejo (Tabla 5), aunque en variedades como la *Moscatel* los compuestos aromáticos (principalmente terpenos) se localizan también en la pulpa. El hollejo es, por tanto, el principal precursor del aroma varietal enriqueciendo a los mostos en compuestos terpénicos (Günata y col., 1985) y precursores de ésteres, aldehídos y alcoholes (Schmidt y Noble, 1983).

Tabla 5. Localización de compuestos aromáticos en la uva (Hidalgo, 2006)

| Localización en la uva | |
|------------------------|---|
| Terpenos | Repartidos entre la pulpa y la parte interior del hollejo o mayoritariamente en el hollejo |
| Terpenoglucósidos | Mayoritariamente en el hollejo |
| Carotenos | Exclusivamente en partes sólidas de la uva, sobre todo en el hollejo. No existe en mostos sin macerar |
| Ácidos grasos | 65-70% en el hollejo y 25-40% en la pulpa |
| Ésteres fenólicos | Mayoritariamente en el hollejo |

En la práctica, se aplica esta técnica a una vendimia despalillada, moderadamente estrujada y ligeramente sulfitada (3-4 g/hL) o colocada en atmósfera de gas neutro, ya que debe estar protegida de la oxidación (Le Fur, 1990a; Sapis, 1995) y su incidencia negativa sobre la calidad. Se favorece el contacto del mosto con el hollejo controlando el tiempo de maceración y la temperatura (factores extrínsecos) a la que se realiza la misma. Luego, el

proceso de maceración se basa en una combinación del tiempo de maceración con la temperatura, sin embargo, no existe una regla general que se aplique a todas las situaciones. Así, en la bibliografía se puede observar bastante controversia con respecto a los resultados obtenidos según el tiempo, temperatura, variedad y estado sanitario de la uva a la que se le aplica la maceración. Estos factores, algunos de ellos intrínsecos (maduración y estado sanitario), determinarán la factibilidad o no del proceso (Le Fur, 1990a; Orriols y Moreno, 1992; Ribéréau-Gayón y col. 2003).

Según Delteil y col. (2000), estos parámetros oscilan entre las 4 y las 24 h y los 5 y 20°C, mientras que Ribéréau-Gayón y col. (2003) los sitúa entre las 12-20 h, según la organización de la bodega y a temperatura de 10 a 15°C.

Normalmente, la mayoría de los autores consideran el tiempo de maceración como única variable del proceso, quedando la temperatura como un parámetro previamente fijado entre 15 y 20°C (Baumes y col., 1988; Le Fur, 1990a; Orriols y Moreno, 1992; Falqué y Fernández, 1996a; Guitart y col., 1997; Peinado y col., 2004). Sin embargo, Ramey y col. (1986) afirman que los fenómenos de extracción, hidrólisis, evaporación, oxidación u otras reacciones de los distintos constituyentes de la uva están influidos por los cambios de temperatura.

De forma general, con esta técnica, la composición de los mostos sufre modificaciones sobre: aromas, compuestos fenólicos, acidez, poliósidos y compuestos nitrogenados. Dichas modificaciones junto con las transformaciones que tienen lugar durante la fermentación van a tener gran repercusión sobre la composición y características del producto final.

3.1.1.1. Influencia sobre la acidez de mostos y vinos

Uno de los principales efectos de la maceración pelicular es la disminución de la acidez de los mostos de manera más o menos acusada. Durante el proceso tiene lugar la solubilización del potasio liberado del hollejo (Orriols y Moreno, 1992), lo cual provoca la salificación parcial del ácido tartárico. Como consecuencia se produce una disminución de la acidez total (1-1,5 g ácido sulfúrico/L) (Delteil y col., 2000; Ribèreau-Gayón y col., 2003) y un aumento del pH de los mostos, sobre todo en las primeras horas de maceración (5-7 horas) (Dubordieu y col., 1986).

Según Le Fur (1990a), la extracción de potasio se produce tanto en la maceración como en el prensado, aumentando en este último con el tiempo de maceración. Para evitar una disminución excesiva de la acidez, Sapis (1995) recomienda realizar maceraciones cortas y prensados poco intensos.

Por otra parte, la variedad y el terreno van a ejercer también gran influencia en el efecto de la maceración sobre la acidez (Ribèreau-Gayón y col., 2003). Sin embargo, se ha comprobado que la influencia del tiempo de maceración es más importante, de manera que cuanto más intenso es el proceso, más baja es la acidez. Así, mientras que en la mayoría de las variedades estudiadas (*Semillón*, *Sauvignon*, *Moscatel*, *Albariño*, *Treixadura*, etc) la disminución de la acidez es evidente, en el caso de la variedad *Chardonnay*, para cortos períodos de maceración (4 h) y bajas temperaturas (15°C) no se produce disminución de la acidez total y la disminución de ácido tartárico no es consistente con el contenido en K y el pH (Cheynier y col. 1989).

La acidez de los mostos condiciona la acidez de los vinos de manera que una baja acidez de los primeros conduce a vinos también con acidez baja. Sin embargo, este fenómeno puede corregirse por la acidificación de los mostos con ácido tartárico. Sobre todo cuando la variedad empleada en el proceso de maceración sea de baja acidez como la variedad *Palomino*

fino. En este caso el proceso de maceración pelicular contribuye aún más a la disminución de la acidez y al aumento del pH (Darias-Martín y col. 2000).

3.1.1.2. Influencia sobre el contenido en polifenoles de mostos y vinos

Durante la maceración pelicular se produce un enriquecimiento del mosto en compuestos fenólicos, reflejado en un aumento de la densidad óptica a 280 nm y del índice de polifenoles de los mostos (Darias-Martín y col., 2000) (Tabla 6). Sin embargo, en los vinos son menores las diferencias y la densidad óptica a 280 nm se mantiene inferior a 10, límite superior generalmente admitido para los vinos blancos (Ribéreau-Gayón y col., 2003) (Tabla 7).

Tabla 6. Incidencia de la maceración pelicular (18 h a 20°C) sobre los compuestos fenólicos de los mostos (Dubordieu y col., 1986)

| Variedad | Inicio de maceración | | Fin de maceración | |
|--------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | DO 280 | Índice polifenoles | DO 280 | Índice polifenoles |
| Sauvignon 5 | 4,4 | 3,5 | 6,5 | 4,9 |
| Semillón 1 | 4,6 | 3,1 | 5,6 | 4,3 |
| Muscadelle 1 | 4,3 | 3,2 | 6,1 | 4,4 |

Tabla 7. Incidencia de la maceración pelicular (18 h a 20°C) sobre los compuestos fenólicos de los vinos (Dubordieu y col., 1986)

| Variedad | Prensado inmediato | | Maceración | |
|-------------|--------------------|--------------------|------------|--------------------|
| | DO 280 | Índice polifenoles | DO 280 | Índice polifenoles |
| Sauvignon 1 | 6,7 | 3,3 | 7,5 | 3,3 |
| Sauvignon 3 | 6,3 | 3,3 | 8,1 | 4,7 |
| Sauvignon 4 | 5,6 | 3,3 | 5,8 | 3,0 |

En principio la extracción de compuestos fenólicos debería ser moderada dada la débil solubilidad de los estos compuestos en fase acuosa (Delteil y col., 2000). Sin embargo, su extracción parece estar favorecida por las altas temperaturas y tiempos de maceración

ANTECEDENTES

prolongados, así como por la presencia de sulfuroso (Sapis, 1995), que tiene un efecto solubilizante sobre los polifenoles (Amati y col., 1992).

Según Ramey y col. (1986), existe una correlación positiva significativa entre la temperatura de contacto con el hollejo y el contenido en polifenoles totales (flavonoides y no flavonoides) en mosto y los resultantes en vinos. Asimismo, afirman que tanto el color como la capacidad de pardeamiento aumentan con la temperatura por encima de los 15°C, debido a una extracción excesiva de polifenoles (Marais, 1998), y que se limita la extracción de flavonoides controlando la temperatura a 10°C o inferiores. Por otra parte, las maceraciones a bajas temperatura (5 y 10°C), pero durante tiempos prolongados (12, 18 y 24 horas) conduce a vinos con mayor pardeamiento e intensidad de color en los que el contenido en compuestos fenólicos también es mayor (Gómez-Míguez y col., 2006).

Según Doubordieu y col. (1986) y Sapis (1995), el aumento de polifenoles no siempre es tan sistemático. En muchas ocasiones, los índices de polifenoles totales de vinos de maceración corta y prolongada son similares (Sapis, 1995); y los vinos procedentes de vendimia mecánica presentan un contenido en polifenoles superior al de los procedentes de vendimia manual. Esto se debe a que también juegan un papel decisivo en el contenido final de polifenoles, la intensidad del molturado y las condiciones de extracción (intensidad del prensado, tipo de prensa, etc.) y el desfangado (con una presencia más o menos importante de fangos durante la fermentación) después del proceso de maceración (Dubordieu y col., 1986).

Además, no todas las variedades tienen el mismo comportamiento de extracción durante la maceración pelicular. Así, mientras que para el mosto de la variedad *Sauvignon* el índice de polifenoles aumenta rápidamente en las primeras horas de maceración, para las variedades *Semillón* y *Moscatel* el aumento se produce de forma continua en el transcurso de la misma (Doubourdieu y col., 1986). Amati y col. (1992), observan también distintos comportamientos para las variedades *Verdecchio*, *Bianchetto* y *Maceratino*, de manera que en todos los casos se produce una disminución del contenido polifenólico en las primeras horas de

maceración (8 y 16 horas para *Verdeccchio* y las dos últimas respectivamente) para mantenerse o aumentar sensiblemente a partir de ese momento. Para la variedad *Trebbiano* los mismos autores observan que la extracción es más lenta pero continuada durante todo el proceso.

El principal inconveniente de la extracción de polifenoles es que, si se produce de manera excesiva, puede tener efectos negativos sobre la calidad del vino aumentando su coloración, amargor y astringencia (Gutiérrez y col., 1990).

Ciertos fenoles pueden actuar como precursores de oxidaciones enzimáticas en el mosto y posteriormente la oxidación autocatalítica en el vino. Este fenómeno puede dar lugar a matices dorados más intensos y, a veces, a polímeros amarronados (Darias-Martín y col., 2000). Asimismo, estos compuestos pueden contribuir al amargor y a la astringencia de los vinos actuando también como sustratos de oxidación. Dicho efecto aumenta con la temperatura y la utilización de sulfuroso (Orriols y Moreno, 1992). Sin embargo, algunos de estos compuestos pueden tener efectos positivos por su contribución al aroma y sus efectos beneficiosos sobre la salud humana (Frankel y col., 1995; Darias-Martín y col., 2000).

Otro aspecto de la maceración pelicular a tener en cuenta, es que las oxidaciones que se pueden producir durante la misma implican un proceso en el que intervienen, por un lado, sustratos de oxidación, como los compuestos fenólicos procedentes de la uva y extraídos del hollejo, y por otro, las enzimas polifenoloxidasas procedentes de la uva. Luego, el contenido en sustancias polifenólicas en los mostos depende de un compromiso entre la actividad enzimática y la extracción de los polifenoles oxidables (Amati y col., 1992). Los resultados obtenidos por Fernández-Zurbano y col. (1999), confirman que en la maceración están envueltos ambos procesos (extracción y oxidación) y que, hasta alcanzar el máximo predomina la extracción; después de este punto, el proceso de oxidación es el dominante.

Cada una de las operaciones prefermentativas (prensado, sulfitado, desfangado) que se realizan con la uva tienen una incidencia particular sobre la actividad polifenoloxidas (PPO)

(Crouzet y col., 2000). Asimismo, cada variedad presenta una evolución particular de dicha actividad. Así, mientras que en la variedad *Verdicchio* la actividad PPO disminuye considerablemente durante el proceso de maceración, en el caso de la variedad *Trebbiano*, las variaciones no son significativas (Amati y col., 1992). Según Fernández-Zurbano y col. (1999), en estudios de maceración realizados con las variedades *Macabeo* y *Chardonnay*, la actividad PPO aumenta rápidamente a partir de las 4 horas de maceración.

Para evitar las alteraciones oxidativas (“quiebra oxidásica”) causadas por la actividad PPO es necesario macerar a temperaturas por debajo de 10°C (criomaceración) ya que a temperatura ambiente es prácticamente imposible evitarlas. Además, a dicha temperatura se limita la extracción de compuestos polifenólicos (Amati y col., 1992). Otra alternativa, propuesta por Cheyner y col. (1992), es la hiperoxidación de los mostos tras el prensado, proceso que disminuye el contenido polifenólico degradando los flavanos y estabilizando los vinos frente al pardeamiento. Marais, en 1998, propone también como alternativa que la vinificación se realice en condiciones reductoras para mejorar la calidad de los vinos y disminuir el contenido en polifenoles.

3.1.1.3. Influencia sobre el contenido en nitrógeno de mostos y vinos

Durante el proceso de maceración el mosto se enriquece en nitrógeno total (Aldave, 1992; Aldave y col., 1992), aminoácidos y nitrógeno proteico (Dubordieu y col., 1986; Aldave, 1992; Aldave y col., 1992; Dubourdieu y col., 1989). Una parte importante de este nitrógeno aminado es degradado por las levaduras durante la fermentación alcohólica, lo que se ve reflejado en la velocidad fermentativa (Sapis, 1995; Delteil y col., 2003).

El aumento en proteínas de los mostos va a depender de la variedad, así, mientras que en la *Semillón* y *Moscatel* este aumento es del doble, en la *Sauvignon* es tres veces mayor. Por otra

parte, durante el prensado y el desfogado los mostos siguen enriqueciéndose en aminoácidos por el contacto con las burbas (Dubordieu y col., 1986).

Según Guitart y col. (1997), después de la maceración los mostos tienen mayores concentraciones de aminoácidos a excepción del ácido aspártico, la prolina y la metionina. Asimismo, señalan que el efecto de la maceración de los mostos sobre el vino es un aumento de todos los aminoácidos excepto la prolina, aunque dicho contenido parece estar más influenciado por el proceso de maceración que por la duración de la misma (tiempo de maceración), sobre todo en vinos almacenados durante 6 meses.

Otros autores, sin embargo, como Hernández-Orte y col. (1998), señalan que el contenido en aminoácidos de los mostos macerados de la variedad *Macabeo* es más bajo que en los no macerados. El contenido total de nitrógeno en mostos está por debajo del nivel mínimo para el crecimiento de las levaduras (130-140 mg/L), luego se produce una pérdida de nutrientes en el medio que conduce a problemas de fermentación y menores contenidos de aminoácidos en los vinos. Además, la ausencia de aminoácidos en el mosto inhibe la ruta biogénica de los alcoholes superiores realzando la formación de ácidos grasos y ésteres frutales (Hernández-Orte y col., 1998).

3.1.1.4. Influencia sobre el contenido en polisacáridos de mostos y vinos

Los polisacáridos poseen numerosas propiedades estructurales y funcionales destacables entre los constituyentes de la uva y del vino. Su papel estructural en las paredes celulares de la uva les hace intervenir para modular la extracción de los constituyentes aromáticos y fenólicos. En mostos y vinos intervienen en la mayoría de los fenómenos coloidales como la decantación, la formación o prevención de turbios o precipitados y, en parte, son responsables del colmatado de los soportes filtrantes, y de la estabilidad de la espuma de los vinos espumosos y petillants (Pellerín y Cabanis, 2000).

ANTECEDENTES

Según Doco y col. (1996), únicamente una pequeña parte de polisacáridos pécticos es soluble desde el estrujado o el prensado de la uva. Luego, toda etapa que permita la maceración de las paredes celulares (partes sólidas de la uva) con el mosto, va a permitir una mejor extracción y enriquecimiento del vino en polisacáridos pécticos.

El desfangado, la adición de bentonita, la maceración pelicular, la aplicación de preparados enzimáticos comerciales, la intensidad del prensado y la temperatura, son factores que influyen sobre la solubilización de los polisacáridos de la uva (Pellerín y Cabanis, 2000).

Tabla 8. Incidencia de la maceración pelicular sobre el contenido de los polisacáridos totales de los vinos (mg/L) (Dubordieau y col., 1986)

| Variedad | t maceración | Prensado directo | Macerado |
|-----------------|---------------------|-------------------------|-----------------|
| Sauvignon | 12 h | 389 | 469 |
| Sauvignon 3 | 12 h | 356 | 547 |
| Sauvignon 4 | 12 h | 385 | 520 |
| Sauvignon 6 | 12 h | 266 | 359 |
| Semillón 1 | 18 h | 362 | 435 |
| Semillón 2 | 18 h | 228 | 442 |
| Muscadelle 1 | 18 h | 290 | 373 |

Según numerosos autores (Dubordieau y col., 1986; Sapis, 1995; Delteil y col., 2000; Ribéréau-Gayón y col., 2003), durante la maceración pelicular, se produce una disminución de polisacáridos ácidos (pectinas) y un aumento más o menos importante de polisacáridos neutros de mostos y vinos (Tabla 8). Este fenómeno se asocia muchas veces a un aumento de la calidad de las sensaciones en boca, de volumen, de cuerpo, que a menudo aparecen en este tipo de vinos.

3.1.1.5. Influencia sobre el contenido en ácidos grasos de mostos y vinos

La maceración realza la extracción de ácidos grasos, especialmente los de cadena larga (C14, C16 y C18 así como los insaturados C16:1, C18:1 y C18:2) (Ferreira y col., 1995; Valero y col., 2001), hecho que se ve reflejado en los vinos, que presentan mayores contenidos de ácidos grasos C10-C12 (Aldave de las Heras y col., 1992). Sin embargo, los ácidos grasos de menor peso molecular (C4, C6 y C8) aumentan sólo ligeramente (Falqué y Fernández, 1996a), la mayor parte se excreta al medio durante la fermentación como resultado del metabolismo de la levadura (Valero y col., 2001). Estos ácidos de cadena media son intermedios biosintéticos de los ácidos grasos de cadena larga (Viegas y col., 1989).

En los vinos es difícil establecer una pauta en cuanto al contenido de ácidos grasos con respecto al tiempo de maceración, ya que el metabolismo de las levaduras influye notablemente en el mismo. Aun así, Valero y col. (2001) señalan que parece existir una relación entre el contenido en ácidos grasos del mosto y el del vino, de manera que cuando dicho contenido aumenta en el mosto disminuye en el vino. Según explican dichos autores, el índice de biosíntesis de ácidos grasos por parte de la levadura durante la fermentación alcohólica es más bajo y más prolongado cuanto mayor es la extracción en el mosto, con lo cual se excretan menos intermedios biosintéticos de ácidos grasos al vino.

3.1.1.6. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles de los mostos y vinos

Aunque la riqueza de los mostos en compuestos volátiles depende fundamentalmente de la variedad, la maceración entraña un enriquecimiento mucho más significativo (Baumes y col., 1988; Selli y col., 2003).

Según la intensidad con que se aplique el proceso (tiempo y temperatura de maceración), el mosto se enriquece tanto en compuestos aromáticos libres como precursores de aroma procedentes de las partes sólidas de la uva. Sin embargo, según algunos autores (Cabaroğlu y col., 1997; Delteil y col., 2000; Selli y col., 2003), el aumento del aroma libre es más significativo ya que, con tiempos relativamente cortos de maceración, se pueden manifestar sistemas enzimáticos que hidrolizan una parte de las formas glicosiladas del aroma conduciendo a un enriquecimiento del mosto en compuestos volátiles (Cordonnier y col., 1986). Por otra parte, procesos como el molturado y prensado influyen también en los niveles de ambos en el mosto (Reynolds y col., 1993).

Durante el proceso de maceración, el mosto se puede enriquecer tanto en compuestos aromáticos deseados con aromas afrutados o florales, como en compuestos aromáticos desagradables de tipo herbáceo originados por vía enzimática oxidativa (aldehídos y alcoholes de 6C). Asimismo, se produce un aumento considerable de terpenos, sobre todo nerol y geraniol (Dubordieu y col., 1986; Baumes y col., 1988; Selli y col., 2003), el cual también va a depender del retraso de la cosecha o de un prensado prolongado, factores que realzan el contenido terpénico de los mostos (Reynolds y col., 1993).

Aunque, no se puede establecer una relación directa entre la riqueza del mosto en compuestos volátiles y la del vino final debido a los grandes cambios en la composición que se producen durante la fermentación alcohólica (Cabaroğlu y col., 1997; Delteil y col., 2000), está claro que la maceración pelicular aumenta los compuestos volátiles en el vino.

Por una parte, se produce un ligero aumento de metanol y mayor proporción de acetatos y ésteres con aromas florales y agradables (Orriols y Moreno, 1992; Falqué y Fernández, 1996a; García-Romero y col., 1999). El aumento del primero se debe al tiempo de contacto entre las pectinas y la pectinmetilesterasa natural de la uva (Ramey y col., 1986), mientras que el aumento de ésteres y acetatos se debe probablemente a un mayor contenido

en aminoácidos del mosto que conduce a vinos ricos en ésteres y pobres en alcoholes superiores (Falqué y Fernández, 1996).

La presencia de alcoholes de 6 átomos de carbono, como el hexanol, va a depender de la intensidad del macerado, pero también de la madurez del fruto, las condiciones de desfangado y de fermentación (Ferreira y col., 1995; Ramey y col., 1996). Así, mientras los vinos *Chardonnay* prensados directamente contienen 3,55 mg/L de hexanol frente a los 275 mg/L de los macerados y no desfangados, cuando se realiza un desfangado con adición de enzimas el contenido en hexanol disminuye considerablemente (1,58 mg/L) (Le Fur, 1989). Por otra parte, la actividad de las levaduras durante la fermentación transforma dichos compuestos a n-hexanol, menos aromático (Ramey y col., 1996). Si la uva no está madura, los hollejos de uva verde pueden dar vinos con un aroma marcadamente herbáceo debido a la excesiva cantidad de compuestos 6C (Baumes y col., 1989; Ferreira y col., 1995)

La maceración pelicular también aumenta los contenidos de aldehídos y cetonas tanto positivos (β -damascenona y acetovainillina) como negativos (aldehído, acetoína y diacetilo), aunque Mareira y col (2006), señalan que estos últimos no influyen considerablemente en el perfil aromático de los vinos.

En cuanto a los terpenos, Dubordieu y col. (1986), señalan que los contenidos en terpenos de los vinos obtenidos por maceración pelicular suponen un 25-40% más de los obtenidos por vinificación tras prensado inmediato. Asimismo, Baumes y col. (1989a y b), muestran aumentos significativos de los principales alcoholes terpénicos libres constituyentes de la tipicidad aromática de la variedad *Moscatel de Frontignan* y señalan que, en variedades no aromáticas (*Bourboulenc*, *Chardonnay*, *Chenin*, *Semillón* y *Sauvignon*), se registran aumentos considerables de las grandes familias de compuestos que constituyen el aroma libre en los vinos.

El contacto mosto-hollejos favorece la extracción de precursores de aromas que se liberan durante la fermentación y conservación del vino (Dubordieu y col., 1986; Aldave de las Heras y col., 1992). Sin embargo, la difusión de sustancias aromáticas durante la maceración es más lenta que la de otros constituyentes de los hollejos (K, compuestos fenólicos) lo que explica porqué, en ciertos casos, no se obtienen mejores resultados aun realizando maceraciones prolongadas (Dubordieu y col., 1986).

3.1.1.7. Influencia sobre las características organolépticas de los vinos

Desde el punto de vista organoléptico, los vinos de maceración pelicular son bien aceptados, bien equilibrados, más redondos, con más cuerpo en boca (Le Fur, 1986; Sapis, 1995). Destacan por presentar mayor intensidad aromática y características sensoriales en las que domina el afrutado (frutas exóticas, miel, anís), lo que resalta el carácter varietal (Dubordieu y col., 1986; Le Fur, 1989; Sapis, 1995; Darías-Martín y col., 2000). Este aroma varietal avanza con la fermentación alcohólica (Dubordieu y col., 1986) y refuerza el carácter varietal del vino (Sapis, 1995).

Estas características de los vinos macerados se presentan incluso cuando los vinos se obtienen por maceración y fermentación realizadas al mismo tiempo. Según García-Romero y col. (1999) los vinos obtenidos en estas condiciones presentan mayor intensidad aromática, aroma y sabor más afrutado, menor aroma herbáceo, menor acidez y más cuerpo que los vinos sin hollejos (García-Romero y col., 1999).

Sin embargo, no se puede olvidar que, a veces, aparecen efectos negativos que incluso modifican la tipicidad con aromas pesados y con falta de finura, así como gustos herbáceos y amargos (Sapis, 1995). En este sentido, en las características organolépticas del producto final no sólo influyen las condiciones de maceración sino también la variedad (Cheyner y col., 1989; Peinado y col. 2004). Un claro ejemplo lo tenemos con los estudios realizados por Peinado y

col. (2004), quienes basándose en descriptores aromáticos (disolvente, floral, graso, afrutado y balsámico), afirman que, para las mismas condiciones, la maceración aumenta las series disolvente, floral y dulce y disminuye la afrutada y balsámica en el aroma de los vinos *Macabeo* y *Airén*, siendo dicho aumento más notable en el caso de los vinos *Macabeo*.

3.1.1.8. Importancia de la temperatura y el tiempo de maceración

En los numerosos estudios realizados sobre la maceración pelicular existen divergencias en cuanto a los efectos positivos y negativos de dicho proceso. Mientras muchos autores establecen que la maceración pelicular enriquece el mosto en compuestos volátiles, y esto está en relación directa con la riqueza final del vino (Ramey y col., 1986; Baumes y col., 1989), otros ponen de manifiesto que durante la maceración se extraen compuestos de 6 átomos de carbono que conducen a aromas desagradables de tipo herbáceo (Cordonnier y Bayonove, 1981; Crouzet, 1986), además de, a la extracción de compuestos polifenólicos susceptibles de conducir a productos más coloreados, astringentes o amargos.

Por otra parte, muchos autores han estudiado la influencia del tiempo de maceración (Dubordieu y col., 1986; Gutiérrez y col., 1990; Le Fur, 1989; Falqué y Fernández, 1996a; Guitart y col., 1996; García-Romero y col., 1999; Selli y col., 2006a y b) y la temperatura (Ramey y col., 1986; Amati y col., 1992; Marais y col., 1998; Asselin y col., 1999) sobre el proceso de maceración para determinadas variedades. De forma generalizada en todos los casos se puede hablar de una disminución de la acidez y un aumento de pH, compuestos polifenólicos y compuestos volátiles; sin embargo, los resultados obtenidos no son siempre los deseados observándose, para los mismos tiempos y temperaturas de maceración, diferencias significativas en cuanto a las características organolépticas del producto final determinadas por la propia variedad. Así, para una misma temperatura, mientras que para la variedad *Chenin blanc* el tiempo óptimo de maceración es de 0 horas, la calidad de los vinos de otras variedades como *French colombar*, *Chardonnay* y *Semillon* mejora con la maceración (Singleton y col., 1980).

ANTECEDENTES

Luego, tal y como afirman Gutiérrez y col. (1990), es conveniente conocer un tiempo óptimo de maceración para cada variedad y en cada zona para obtener vinos de calidad evitando los posibles efectos negativos que también puede suponer la maceración pelicular.

Por otra parte, es importante realizar un buen control de la temperatura para evitar los posibles efectos negativos de la maceración pelicular. Así, cuando se realiza a temperatura ambiente, no se evitan las alteraciones oxidativas causadas por la actividad enzimática y la extracción de compuestos aromáticos, cuya difusión es más lenta que la de otros componentes de la película (K, fenoles), se produce mucho después que la de polifenoles. Por eso, en muchos casos, un aumento del tiempo de maceración no conduce a buenos resultados. Por otra parte, puede darse un comienzo precoz de la fermentación durante la maceración, con formación de etanol y, como consecuencia la solubilización de compuestos fenólicos en el vino (Delteil y col., 2000).

Como se puede observar en la Tabla 9, distintos autores han estudiado el tiempo y temperatura óptimos de maceración para distintas variedades.

Tabla 9. Condiciones óptimas (tiempo y temperatura) de maceración para cada variedad según diferentes autores.

| Autores | Variedades | Tiempo maceración | Tª maceración |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|--|
| Amati y col., 1992 | <i>Bianchello y Maceratino</i> | 12-14 h | Refrigeración rápida a 10°C y posterior bajada gradual hasta 5°C |
| | <i>Verdicchio y Trebbiano</i> | 18 h | |
| Orriols y Moreno, 1992 | <i>Albariño</i> | 10 h | 20°C |
| Falqué y Fernández, 1996 | <i>Treixadura</i> | 5 h | 17°C |
| Cheynier y col., 1989 | <i>Chardonnay</i> | 4 h | 15°C |
| Darias-Martín y col., 2000* | <i>Palomino fino</i> | 24 h | 16°C |
| García-Romero y col., 1999* | <i>Airén</i> | 20-30 h | 15 °C |
| Selli y col., 2006a | <i>Moscatel de Bornova</i> | 6 h | 15°C |

El proceso de maceración pelicular exige, por tanto, un cierto número de condiciones para que se obtengan resultados satisfactorios (Sapis, 1995):

- 1º) Debe realizarse sobre uvas obtenidas de un buen terreno, maduros, sanos, moderadamente molturadas y protegidas contra la oxidación.
- 2º) Debe estar adaptada a cada variedad en cuanto a tiempo y temperatura de maceración.
- 3º) Han de tenerse en cuenta las operaciones de molturado (si es intensa se favorece la extracción de polifenoles), de prensado y desfangado que también inciden en los efectos producidos por la maceración.

3.1.2. Supraextracción

La supraextracción es una técnica consistente en prensar la vendimia entera después de su congelación-descongelación. Es una variante de la técnica utilizada para la elaboración de los tradicionales “Icewine” o “vinos de hielo” y que consiste en prensar la vendimia parcialmente congelada de forma natural (crioextracción selectiva o crioselección). La crioextracción utiliza el frío para congelar parcialmente la vendimia antes del prensado. Se somete a la uva a una temperatura próxima a -4°C , con lo cual las uvas de mosto pobre en azúcares se congelan, mientras que las muy azucaradas no, liberando el mosto durante el prensado. Esta selección de mosto más azucarado permite aumentar el grado alcohólico potencial de la cosecha (Chauvet y col., 1987).

La puesta en práctica de la técnica de supraextracción es particularmente simple; se trata de congelar la uva entera, recolectada manualmente y después descongelarla a una temperatura normal (10°C) antes de someterla al prensado y posteriormente a la fermentación (Defranoux y col., 1988).

Este tratamiento de congelación-descongelación supone importantes cambios de las características de la uva, lo que se aprovecha en la vendimia para extraer la totalidad del mosto facilitando a su vez la liberación de elementos celulares compatibles con el aumento de su calidad (Chauvet y col., 1987).

A pesar de que la congelación es uno de los métodos más eficaces y suaves para la conservación de alimentos aumentando considerablemente su vida útil, es imposible evitar ciertas modificaciones de los mismos durante su aplicación. Estas modificaciones serán más o menos importantes dependiendo en gran medida de la velocidad de congelación (y descongelación) y de las características del producto.

El proceso de congelación va a inducir a una serie de cambios irreversibles en los tejidos a los que se les conoce como daños por congelación y que se manifiestan tras la descongelación. Estos cambios son consecuencia de muchos procesos separados entre los cuales se destacan en los tejidos vegetales: daños por enfriamiento (Mallet, 1994), daños por concentración de soluto (Ordoñez, 1998), daños por la formación de cristales de hielo (Ordoñez, 1998; Rodríguez, 2002) y daños por variaciones en el volumen (Ordoñez, 1998).

Luego, la congelación de los vegetales, sobre todo si se lleva a cabo lentamente, implica modificaciones importantes de la estructura de los tejidos que pueden facilitar la extracción de compuestos intra y extracelulares. Con la técnica de supraextracción se aprovecha este fenómeno para extraer los compuestos de mayor interés de la uva.

Según Chauvet y col. (1987), como consecuencia de la congelación durante la supraextracción, se producen modificaciones importantes en la estructura del tejido de la baya:

- Un aumento del volumen de la baya que puede provocar desgarros.

- Un aumento de la presión interna del fruto, debido a la formación de hielo, que permite separar y, a veces, desgarrar las paredes celulosopécticas que envuelven las células de la baya
- Modificaciones de concentración que van a poner en juego los fenómenos osmóticos con la consecuente desecación del protoplasma y separación de las membranas celulares de las paredes.
- La degradación de los tejidos de la baya por formación de cristales muy puntiagudos, que, junto con el prensado, permiten una mayor degradación del interior de las células y las diferentes paredes que las rodean.

Luego, la congelación y descongelación de los hollejos y de las capas subepidérmicas provocan modificaciones de la ultraestructura de los tejidos produciendo un efecto comparable al de la maceración pelicular y que se va a reflejar en los cambios que sufre la composición del mosto y la calidad del vino (Ribéreau-Gayón y col., 2003).

La formación de cristales de hielo durante la congelación causa rotura de los tejidos de la uva liberando altas concentraciones de solutos (azúcares, ácidos, sales, polioles y compuestos volátiles) en el mosto (Chauvet y Sudraud, 1992; Joseph, 1992). Normalmente se produce un aumento de la calidad del aroma, tanto en intensidad como en complejidad, una ligera disminución de la acidez (del mismo origen que en la maceración pelicular) con el consecuente aumento del pH, y un ligero aumento en compuestos fenólicos (Delteil y col., 2000). Según Ribéreau-Gayón y col. (2003), la supraextracción se manifiesta también por un aumento de la extracción de los azúcares de orujo (0,3-0,6% vol.) y favorece sobre todo la liberación de aromas y sus precursores, limitando la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, Simonato y col. (2005), señalan que los daños producidos en el hollejo por la baja temperatura aumenta la extracción de fenoles totales, catequinas y proantocianidinas, pero que el alcance de esta extracción depende de la temperatura de prensado y de la variedad.

ANTECEDENTES

Por otra parte, Chauvet y col. (1987) afirman que los efectos de la supraextracción son siempre positivos y se ven reflejados en un aumento del porcentaje de alcohol probable (5-29%) sin pérdida de volumen, así como un aumento de glicerol, ácido málico y fosfórico. Además, el prensado después de la descongelación permite extraer un suplemento de azúcares reductores del orden del 8% (Chauvet y col., 1986).

En estudios realizados por Joseph (1992) sobre la variedad *Chardonnay* se pone en evidencia, además de la disminución de acidez y el aumento del pH, un aumento del 1% del contenido en alcohol y un aumento del 50-85% en los terpenoles del vino que realzan su aroma. No obstante, Roldán y col. (2006), aplicando esta técnica a la variedad *Palomino fino*, observan una disminución del grado alcohólico y destacan sobre todo un aumento de la acidez (debida principalmente al aumento de los ácidos cítrico y málico), de los cationes Na^+ y K^+ , el contenido en glicerol y las concentraciones de metanol, n-propanol e isobutanol.

Aunque la variedad tiene gran influencia sobre el proceso, y la baja temperatura de la uva durante el prensado limita las reacciones de oxidación, tras el tratamiento es conveniente realizar un prensado rápido de intensidad moderada, seguido de un cuidadoso desfangado y un sulfitado suficiente (Delteil y col., 2000). Simonato y col. (2005) proponen el uso de antioxidantes, como el sulfuroso, para evitar el riesgo de oxidación de los compuestos fenólicos y el pardeamiento de los vinos.

Según Defranoux y col. (1988), esta técnica presenta ventajas e inconvenientes:

| VENTAJAS | INCONVENIENTES |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ No perturba la estructura tecnológica del lugar y el ciclo habitual de vinificación, lo que permite amortizar el sistema de enfriamiento. ✓ La supraextracción sobre la vendimia entera mejora el potencial aromático del vino frente a la vinificación tradicional. ✓ Se puede aplicar sobre uva procedente de vendimia mecánica (molturada) aunque se obtienen mejores resultados con la uva entera ya que se limitan los fenómenos oxidativos. | <ul style="list-style-type: none"> ✱ El prensado está impuesto por el plazo de recalentamiento, lo que puede ser un obstáculo en el desarrollo de esta técnica. Sin embargo, se ha observado que un calentamiento brusco con aire caliente durante un corto periodo de tiempo tras la congelación no modifica los aspectos positivos de ésta. |

A nivel práctico, la supraextracción presenta perspectivas reales de aplicación, ya que los efectos del frío mejoran la calidad de la vendimia de tipo mecánica o parcialmente molturada (Defranoux y col., 1988).

III.3.2. MÉTODOS DE LIBERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE AROMAS

Como se comentaba al principio de este trabajo, el potencial aromático de la uva está formado por dos grandes grupos de compuestos. Un grupo constituido por las sustancias aromáticas ligadas a la variedad y que constituyen el aroma varietal libre, y otro constituido por los precursores de aroma (glicósidos, ácidos fenoles, ácidos grasos, etc.) y solubles en agua. Tanto en la uva como en el vino, los compuestos aromáticos se encuentran principalmente como glicósidos, unidos a moléculas de azúcares. Según Hidalgo (2006), los glicósidos más abundantes son los apiosilglicósidos (6-0- α -D-apiofuranosil- β -D-glucopiranososa) y los arabinosilglicósidos (6-0- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranososa), que representan más del 50% del total, mientras que los rutinósidos (6-0- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa) se encuentran entre el 5-15% y los glucósidos entre el 5-10%.

La parte aglicona de estos compuestos son principalmente terpenoles como el linalol, el nerol y el geraniol, aunque también pueden ser óxidos de linalol, dioles y trioles terpénicos. La mayor parte de las variedades de uva encierran a la vez las formas libres del aroma y a los glicósidos, siendo éstos últimos más abundantes (Bayonove y col., 2000). Así, tanto en mostos como en vinos de la variedad *Moscatel*, la concentración de terpenoles combinados es de 1,2 a 1,9 veces mayor que la de formas libres (Günata y col., 1986). Los terpenos se van encontrar mayoritariamente formando glicósidos con la glucosa, arabinosa, ramnosa y apiosa, en proporciones combinado/libre que oscilan entre 2/1 hasta 24/1 según la variedad (Hidalgo, 2006).

El potencial aromático que representan los precursores glicosilados en el mosto de uva permanece prácticamente inalterado a lo largo de la fermentación liberándose lentamente durante el envejecimiento. La transformación de estos precursores en compuestos libres es muy interesante, pues supone aumentar los aromas perceptibles, a partir de un potencial aromático oculto que puede superar hasta diez veces la fracción libre (Bitteur y col., 1989).

Debido a su importancia cualitativa y, sobre todo, desde un punto de vista tecnológico, en muchas ocasiones es deseable transformar los precursores aromáticos no perceptibles constitutivos del aroma ligado en aromas libres volátiles y olorosos. Para llevar a cabo esta transformación es necesario intervenir durante la vinificación recurriendo a métodos a través de los cuales se liberen agliconas aromáticas mediante reacciones hidrolíticas (Francis y col., 1992b). Uno de los métodos más empleados para este fin es la hidrólisis ácida promovida por altas temperaturas, sin embargo, su aplicación está limitada ya que la liberación de aromas depende del pH, la temperatura y el tiempo de calentamiento y, en algunos casos, conduce a un desequilibrio aromático por reordenamiento de las agliconas monoterpénicas.

Actualmente se emplean los denominados métodos de revelación de aromas basados en la hidrólisis enzimática de los precursores aromáticos. Estos métodos son dos y producen mínimos cambios en la composición del mosto o vino. Uno de ellos consiste en la adición al

mosto (o al vino) de preparados enzimáticos capaces de hidrolizar determinados precursores del aroma. El otro es de tipo biológico y utiliza cepas de levadura capaces de hidrolizar algunos precursores de aroma, reforzando así el carácter varietal del vino.

3.2.1. Aplicación de preparados enzimáticos

En la rotura de los glucósidos participan tres tipos de enzimas: los enzimas propios de la uva, enzimas procedentes de las levaduras, y, cuando se añaden, los enzimas exógenos procedentes de ciertos mohos. El carácter enzimático de la uva incluye actividades β -D-glucosidasa, α -L-arabinofuranosidasa y α -L-ramnosidasa (Günata y col., 1985; Aryan y col., 1987). La β -glucosidasa es la enzima principal y se localiza sobre todo en el hollejo presentando una buena afinidad por los monoglucósidos que tienen una aglicona de alcoholes primarios (geraniol, nerol y citrionelol). Sin embargo, por el contrario de las enzimas que liberan los azúcares terminales de los diglucósidos, la β -glucosidasa se inhibe por la presencia de glucosa (Bayonove y col., 1984; Aryan y col., 1987; Crouzet y col., 2000).

En cuanto a las levaduras, excepto las que pertenecen al género *Candida* y *Debaryomyces* no son buenas productoras de glicosidasas. La actividad β -D-glucosidasa de *S. cerevisiae* no se inhibe por la glucosa, sin embargo, es muy baja, y aún menores son las actividades α -L-arabinofuranosidasa y α -L-ramnosidasa durante la fermentación (Delcroix y col., 1994), debido a su inestabilidad al pH del mosto.

La β -D-glucosidasa libera sustancias volátiles (monoterpenoles, norisoprenoides, fenoles volátiles) a partir de monoglucósidos. En el caso de los diglucósidos interviene en una segunda etapa para liberar aglicona después de la ruptura del azúcar terminal por una α -arabinofuranosidasa, una β -D-apiofuranosidasa o una α -ramnosidasa siguiendo un mecanismo secuencial (Fig. 9) (Günata y col., 1988, 1990).

ANTECEDENTES

La débil actividad de las enzimas β -D-glucosidasa de las uvas y las levaduras y su inestabilidad en los mostos y los vinos debido al pH hacen que la liberación de sustancias volátiles a partir de precursores glucosilados sea muy limitada durante las fases pre-fermentativa y fermentativa (Bayonove y col., 1984; Delcroix y col., 1994). Por este motivo, desde hace muchos años, se están utilizando preparados enzimáticos comerciales, que presentan la ventaja de ser mucho más estables al pH del vino. Estos enzimas se preparan normalmente a escala industrial a partir de cultivos de *Aspergillus niger* los cuales, además de dar un rendimiento óptimo, son microorganismos GRAS (Generally Recognised As Safe=Generalmente Reconocidos Como Seguros).

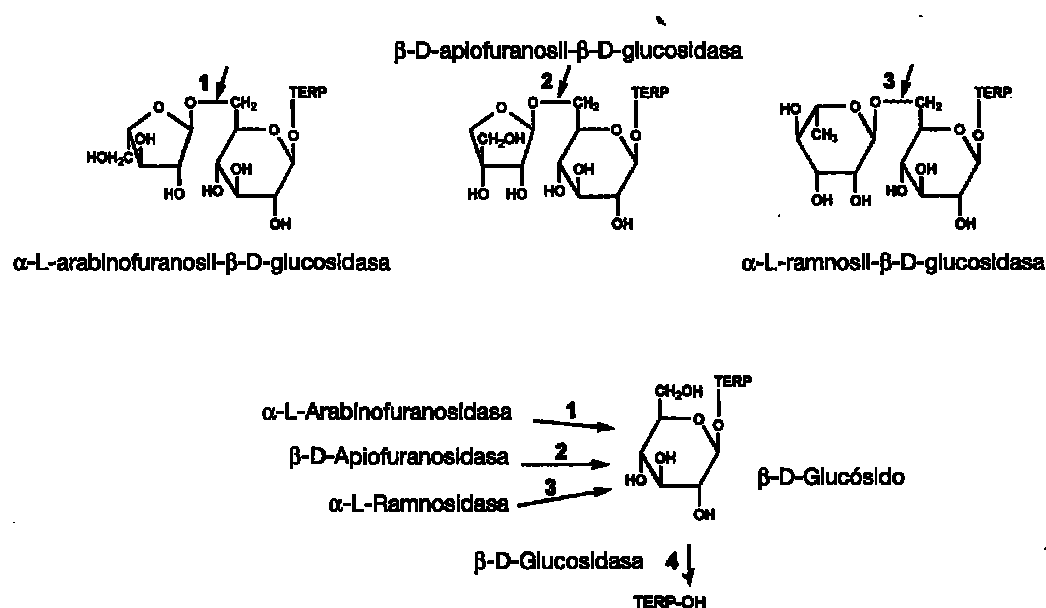


Fig. 9. Mecanismo de hidrólisis de los glicósidos terpénicos (Crouzet y col., 2000)

Estos preparados industriales son una gran herramienta en enología, puesto que tienen numerosas aplicaciones a lo largo del proceso de vinificación (maceración, desfangado, clarificación, extracción de color, etc.). Sin embargo, la mayoría de los preparados comerciales son mezclas que contienen diferentes cantidades de pectinmetilesterasas, poligalacturonasas, pectinliasas y pectatoliasas, y menores cantidades de celulasas, hemicelulasas o glucanasas y glicosidasas relacionadas con la liberación de aromas.

Luego estos preparados enzimáticos comerciales resultan poco específicos para la liberación de aromas y, además, no siempre se obtienen los resultados esperados ya que la actividad glicosidasa de los hongos filamentosos se inhibe por la presencia de glucosa en mostos y suele ser débil e inestable al pH del vino (Bayonove y col., 1984; Aryan y col., 1987; Crouzet y col., 2000).

En este sentido, en los últimos años numerosos autores están trabajando en la caracterización y purificación de enzimas glicosídicos procedentes de otros microorganismos y en la producción de tales enzimas con preferencia a partir de microorganismos GRAS. Entre ellos las especies más estudiadas son las cepas de levadura *Candida molichiana*, *Candida wickerhamii*, *Debaryomyces hansenii* y, de hongos filamentosos, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma harzianum*, *Scytalidium thermophilum* y *Penicillium decumbens*. Los diversos estudios se centran en la búsqueda de enzimas mucho más resistentes a la inhibición por azúcares y estables al pH del mosto y del vino, con actividades más selectivas en la liberación de aromas.

En cuanto a los trabajos realizados sobre enzimas glicosídicas procedentes de hongos, Crouzet y col. (2000) destacan la obtención de una β -glucosidasa de origen fúngico (*Aspergillus sp*) resistente a la inhibición por glucosa y estable al pH del mosto obtenida por Günata y col. (1995). Por otra parte, Fonseca y col. (2004) describen las propiedades de una β -glucosidasa procedente del hongo *Scytalidium thermophilum* que se activa por la presencia de glucosa y xilosa. Spagna y col. (1998 y 2000) purificaron enzimas α -L-arabinofuranosidasa, β -D-glucopiranosidasa y α -L-ramnopiranosidasa de un extracto comercial de *Aspergillus niger*, y las utilizaron para realzar los aromas de extractos de hollejo de *Moscatel*. Las dos primeras incrementaron 3 veces el contenido en terpenoles, mientras que la última, junto a la β -glucosidasa, lo incrementó unas 2,3 veces, sobre todo los contenidos en citronelol, nerol y geraniol, aunque era mucho más estable que otras glicosidasas. Años más tarde, los mismos autores (Spagna y col., 2002a) inmovilizaron una mezcla de dichas enzimas purificadas en geles de quitosan para aumentar su estabilidad en aplicaciones enológicas, ya que anteriormente

ANTECEDENTES

Gallifuoco y col. (1999) habían aplicado enzimas β -glucosidasa inmovilizadas al final de la fermentación demostrando su estabilidad y aplicación en operaciones en continuo.

Para el caso de enzimas procedentes de levaduras, se ha aislado la actividad β -glucosidasa de las cepas *Hansenula spp* (Grossman y col., 1987), *Candida molischiana* y *Candida wickerhamii* (Günata y col., 1990). Asimismo, Yanai y Sato (1999) aislaron y caracterizaron una enzima β -glucosidasa intracelular de la cepa *Debaryomyces hansenii* Y-44 observando que era altamente tolerante a la glucosa y al etanol y que, además, resultaba muy eficaz en la liberación de monoterpenoles glicosilados de mosto de *Moscatel* aumentando considerablemente los contenidos en linalol y nerol (90 y 116% respectivamente). En el caso de una variedad no aromática como la *Palomino fino* el empleo combinado de enzimas α -L-arabinofuranosidas, α -L-rhamnosidasa y β -D-glucosidasa, extraídas de transformantes de *S. cerevisiae*, tras la fermentación conduce a vinos con mayor contenido en alcoholes y terpenoles, sobre todo linalol, aunque por debajo de su umbral de percepción (Genovés y col., 2005).

Entre los extractos enzimáticos comerciales se han usado principalmente Pectinol C (Günata y col., 1985) y Rohapect C (Strauss y col., 1988), que son preparaciones pectolíticas con una actividad β -glucosidasa residual. Así, por ejemplo, Rohapert C no tiene especificidad aglicona, tolera el etanol pero es parcialmente inhibida por la glucosa (Ayrán y col., 1987). Sin embargo, los preparados enzimáticos con mayor riqueza glicosídica (β -D-glucosidasa) desarrollados en los últimos años dan mejores resultado y se emplean una vez finalizada la fermentación.

En general, los enzimas glicosídicos comerciales son capaces de romper los enlaces glicosídicos y transformar los precursores no olorosos constitutivos del aroma ligado en aromas libres volátiles y olorosos, incrementando los compuestos volátiles libres del vino: terpenos, norisoprenoides y fenoles volátiles. Así, aumentan el potencial aromático no sólo de las variedades aromáticas sino también de las variedades no florales o neutras y, además, en un

tiempo relativamente corto. El enriquecimiento puede ser de 1 a 12 veces y los compuestos afectados dependerán de la variedad; así en la mayoría de las variedades afecta tanto a terpenoles como a norisoprenoides y fenoles volátiles, mientras que en las aromáticas se afectan principalmente los terpenoles (Crouzet y col., 2000).

Coutinho y col. (2003) señalan que, la aplicación de un preparado enzimático Lallzyme (Lalvin) con actividades β -glucosidasa, pectinasa, arabinosidasa y ramnosidasa a vinos de las variedades *Maria Gomes* y *Bical*, no conduce a los mismos resultados. Mientras que en el primer caso los vinos aumentaron el contenido en compuestos volátiles en un 9% debido al aumento de ésteres, terpenos y lactonas, en el segundo caso no se produjeron variaciones significativas.

Asimismo, según Castro y col. (2001 y 2002), el preparado enzimático AR2000 (Gist-Brocades) aplicado a vinos de distintas variedades provoca un aumento de los compuestos aromáticos pero en distintas proporciones. En el caso de *Moscatel* de grado menudo, los vinos sufren un aumento en volátiles varietales, sobre todo de linalol, hidroxilinalol, nerol, geraniol, hotrienol, hexanol, benzaldehído y alcohol bencílico. En los vinos *Chardonnay* aumentan los contenidos en hexanol y alcohol bencílico. Y en vinos *Airén* y *Macabeo* aumenta el contenido en terpenos, alcoholes de 6C lineales, benzaldehído, 4-vinilguayacol y vainillina.

Cabaroglu y col. (2003) aplicaron el mismo preparado enzimático a mostos de la variedad *Emir* macerados y sin macerar. Dichos autores observaron que el uso de glicosidasas exógenas aumentaba considerablemente el contenido en volátiles de los vinos y que este aumento era aún más acusado cuando los mostos habían sido previamente macerados (16°C durante 6 h), ya que la maceración aumentaba el contenido glicosídico de los mostos.

Los mismos resultados fueron observados por Sánchez-Palomo y col. (2005) tras aplicar el preparado enzimático AR2000 sobre mostos de las variedades *Airén*, *Macabeo*, *Albillo* y *Chardonnay*. Dichos autores destacan que la variedad ejerce una mayor influencia sobre las características de los vinos que el tratamiento enzimático antes de la fermentación; sin

ANTECEDENTES

embargo, dicho tratamiento da lugar a vinos con más aromas florales y afrutados y algunas notas dulces, a fruta madura.

Según lo visto, los resultados obtenidos tras la aplicación de extractos enzimáticos dependen por tanto de la variedad y de los tratamientos prefermentativos, sin embargo, también dependen de la pureza y selectividad de las enzimas. Así, mientras que la aplicación de Novaron G (Novo Dordisk) aumenta el contenido terpénico libre sin afectar a otros componentes como los acetatos de alcoholes superiores, la aplicación de AR2000 (Gist-Brocades), además de aumentar dicho contenido, muestra actividad hidrolítica sobre los acetatos de alcoholes superiores y actividades esterásicas que conducen a la formación de malato de dietilo y succinato de dietilo (Tamborra y col., 2004).

Estudios recientes muestran que el empleo de Novarom G (Novo Nordisk) (actividades pectinasa y β -glucosidasa) sobre vinos de las variedades *Palomino fino*, *Sauvignon blanco*, *Traminer* y *Viura* aumenta considerablemente el contenido en compuestos aromáticos, principalmente terpenos, siendo éste más importante cuanto más aromática es la variedad (Valcárcel, 2006).

Otra alternativa de la aplicación de preparados enzimáticos, es el uso de enzimas pectolíticas. Estas enzimas degradan la pared celular de los granos (pectinas) y mejoran la extracción tanto del mosto como de compuestos presentes en las partes sólidas. Luego, no sólo mejoran el proceso de extracción, aumentando el porcentaje de mosto liberado y el rendimiento del prensado, sino que además, en la práctica, se pueden usar en combinación con la técnica de maceración pelicular (a baja temperatura y cortos periodos de tiempo) para facilitar y acelerar la extracción del potencial aromático de la uva. Harman y Kubicek (1998), obtuvieron muy buenos resultados combinando ambas técnicas durante cuatro campañas seguidas. En su caso, la mezcla de enzimas procedía de *Trichoderma* y *Aspergillus* y consistía en una mezcla de actividades pectinasas, celulasas y hemicelulasas. Actualmente estos preparados

comerciales se denominan de maceración-licuefacción y son particularmente ricos en dichas actividades enzimáticas (Crouzet y col., 2000).

Ganga y col. (2001), evaluaron el uso de enzimas xilanasa y endoglucanasas, que degradan la pared celular, durante la maceración de uvas *Chenin* observando que no sólo se producía un incremento de terpenos (principalmente α -terpineol y nerol) sino que también aumentaban considerablemente la cantidad de precursores aromáticos no volátiles.

Por otra parte, la presencia de de enzimas hidrolíticas tales como pectinasas y celulasas puede liberar y solubilizar monómeros y oligómeros pécticos y celulósicos (Visser y Voragen, 1996) que pueden ser asimilados por las levaduras como fuente de carbono, nitrógeno o energía para llevar a cabo la fermentación en condiciones óptimas. Estos compuestos son precursores de alcoholes superiores como isobutanol y n-propanol, disminuyendo la concentración de otros alcoholes como el isoamil alcohol (González y col., 1992; Pretorius, 2000).

El inconveniente del empleo de preparados enzimáticos pectolíticos durante la maceración radica en una mayor extracción de compuestos fenólicos, sin embargo, según Fernández-Zurbano y col. (1999), la adición de enzimas pectolíticas acelera el proceso de pérdida de material fenólico y causa una reducción de la actividad polifenoloxidásica. Aunque, por otra parte, existe un mayor nivel de oxidación en los mostos.

Las últimas tendencias van dirigidas a la utilización de enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar proteínas durante la maceración pelicular y enriquecer el medio en aminoácidos, lo que conduciría a una mayor síntesis de ésteres y menor de alcoholes superiores por parte de la levadura (Crouzet y col., 2000). Según recoge Fleet (2003), algunas de estas enzimas podrían provenir de cepas de levadura significativamente proteolíticas de especies no-*Saccharomyces*.

3.2.2. Empleo de cepas de levaduras

Las cualidades del vino en general y su aroma están determinadas por transformaciones microbiológicas llevadas a cabo principalmente por las levaduras. Aunque los hongos y bacterias pueden también interaccionar con las levaduras e influir en las características del vino resultante, las levaduras son los microorganismos predominantes durante la vinificación presentando numerosas actividades: bioadsorbe componentes del mosto, conduce la fermentación alcohólica, biocataliza la transformación de aromas neutros de la uva a componentes activos de aroma, etc. (Fleet, 2003).

Su principal función durante la fermentación alcohólica es la transformación de la mayoría de los azúcares a etanol y CO₂; sin embargo, algunas moléculas de ácido pirúvico pueden ser transformadas en otros productos secundarios como alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, ácidos, lactonas, cetonas, etc. (1% del EtOH formado) que contribuyen significativamente en las características sensoriales de los vinos.

Entre ellos, unos de los más abundantes son los **alcoholes superiores**, que poseen un olor fuerte y pungente y se sintetizan fundamentalmente en la fase de crecimiento exponencial de las levaduras. La mayor parte de los alcoholes superiores producidos por la levadura derivan directamente de los esqueletos carbonados de los aminoácidos que asimilan durante la fermentación alcohólica. El grupo aminado del aminoácido se elimina por transaminación, y el ácido cetónico correspondiente se descarboxila en un aldehído que posteriormente es reducido por la enzima alcohol deshidrogenasa a un alcohol superior (Fig. 10). Sin embargo, al principio de la fermentación, la síntesis de los ácidos cetónicos y los alcoholes superiores correspondientes se realiza a partir del metabolismo de los azúcares vía piruvato.

Los principales alcoholes superiores sintetizados durante la fermentación alcohólica son el n-propanol, isobutanol, los alcoholes amílico e isoamílico y el feniletanol en concentraciones que varían de 50 a 300 mg/L (Barre y col., 2000).

La producción de **ésteres**, los segundos en orden de abundancia, se debe a la presencia en las células microbianas de las enzimas esterases. Se forman en el interior de la célula y solamente a partir de los ácidos grasos formados por los microorganismos.

Los ésteres representan el mayor grupo de compuestos con impacto organoléptico producidos en fermentación por una reacción enzimática en la que se pone en juego los derivados acil grasos del Coenzima A y los alcoholes libres. La producción de ésteres de acetato está directamente relacionada con el nivel de actividad alcohol acetil transferasa en la célula y a las concentraciones respectivas de los alcoholes precursores.

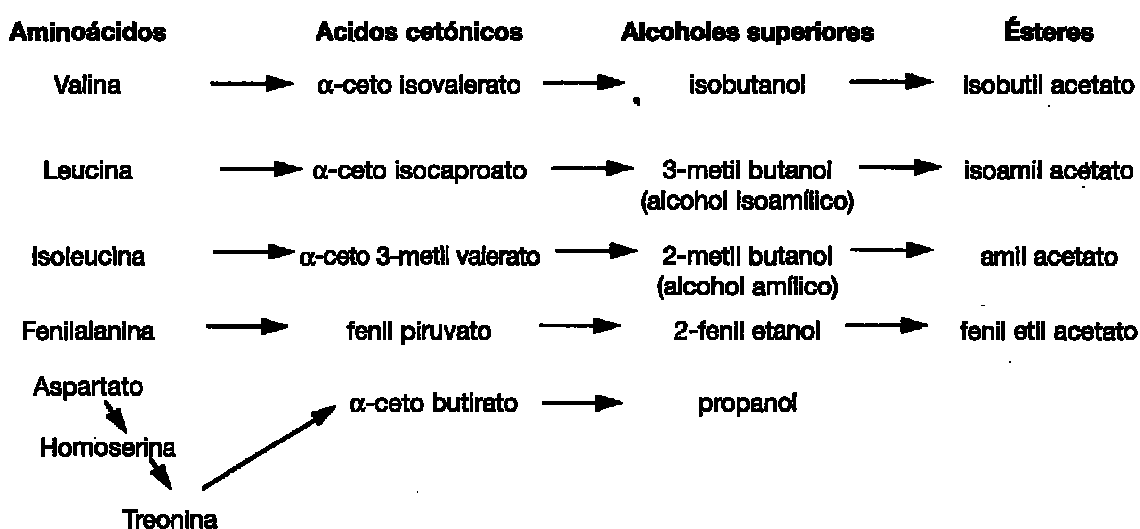


Fig. 10. Esquema de relación entre aminoácidos, ácidos cetónicos, alcoholes superiores y ésteres

Los alcoholes superiores y ésteres juegan un papel importante en el aroma de los vinos, el cual varía dependiendo de los tipos de compuestos presentes y sus concentraciones. La producción de estos compuestos depende de varias condiciones de fermentación tales como la composición del mosto, cultivo de la uva, pH, temperatura, aireación y prácticas enológicas (Ribéreau-Gayón y col., 2003).

Así, las especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *capensis* en ausencia de oxígeno producen menos alcoholes superiores y ésteres, sin embargo, el perfil aromático de los vinos se realza por un aumento del carácter afrutado debido a que el contenido en ésteres es superior al de alcoholes superiores (Valero y col., 2002). Por otra parte, Rojas y col. (2001) señalan que, bajo condiciones altamente aeróbicas, especies no-*Saccharomyces* como *H. guilliermondii* y *P. anomala* producen mayor concentración de ésteres de acetato que *S. cerevisiae*, sin embargo, esta última es la mejor productora de ésteres no acetatos tales como caproato de etilo y caprilato de etilo, lo que pone en evidencia que ambos tipos de ésteres provienen de rutas metabólicas diferentes.

Bajo las mismas condiciones, la capacidad de producir alcoholes superiores es una característica general de las levaduras y su cantidad depende de la cepa usada durante la fermentación (Querol y Ramón, 1996; Zea y col., 1997; Antonelli y col., 1999; Ribéreau-Gayón y col., 2000; Suárez-Lepe, 2002). Sin embargo, la concentración final de alcoholes superiores y ésteres en los vinos no dependen sólo de su síntesis por parte de la levadura, sino también de los equilibrios entre los niveles intra y extracelulares que ponen en funcionamiento el mecanismo de excreción de estos productos al medio. Estos equilibrios van a depender de la cepa de levadura y no son iguales para todos los compuestos (Zea y col., 1997).

Pérez (1979), tras un ensayo de fermentación con 15 cultivos puros de levaduras procedentes del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. (Madrid), realizó una selección de las mismas en función de su poder fermentativo y producción de alcoholes superiores. En dicho estudio, observó gran variabilidad entre cepas e incluso entre las mismas cepas pero con diferente localidad de origen (Tabla 10).

Zohre y Erten (2002), realizando ensayos con cultivos puros y mixtos de las especies *S. cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* observaron que, bajo las mismas condiciones, *S. cerevisiae* producía más etanol y alcoholes superiores que las dos últimas; sin embargo, ésta era menos productora de acetato de etilo y ésteres de acetato y ácidos grasos.

Otras especies como *Hanseniospora osmophila*, *Kloeckera corticis*, que se suelen desarrollar al comienzo de fermentaciones espontáneas, pueden llegar a ser muy perjudiciales por producir bajas concentraciones de alcoholes superiores y altas concentraciones de acético y acetato de etilo (Granchi y col., 2002).

Tabla 10. Producción de etanol (% vol.) y alcoholes superiores (mg/L) por diferentes cepas de levadura (Pérez, 1979).

| Nº cepa | Nombre/Localidad | % vol. | Acetaldehído | Acetato de etilo | n-propanol | Isobutanol | Isoamílicos |
|---------|-----------------------------------|--------|--------------|------------------|------------|------------|-------------|
| 87 | <i>S. ellipsoideus</i> /Montilla | 11,20 | 137 | 6 | 39 | 53 | 135 |
| 152 | <i>S. ellipsoideus</i> /Jerez | 11,25 | 37 | trazas | 46 | 37 | 82 |
| 159 | <i>S. ellipsoideus</i> / Mallorca | 11,15 | 22 | 4 | 27 | 52 | 106 |
| 556 | <i>S. pastorianus</i> /Haro Rioja | 11,1 | 47 | 4 | 23 | 44 | 111 |
| 617 | <i>Z. veronae</i> /Aljarafe | 11,1 | 37 | 15 | 40 | 41 | 165 |
| 706 | <i>Z. acidifaciens</i> /Sanlúcar | 10,5 | 36 | 45 | 32 | 38 | 90 |
| 767 | <i>T. rosei</i> /Jerez | 11,1 | 85 | 3 | 32 | 32 | 96 |
| 979 | <i>S. ludwigii</i> /La Mancha | 11,0 | 53 | 48 | 25 | 42 | 335 |
| 1520 | <i>S. mangine</i> /Jerez | 11,15 | 130 | 10 | 39 | 65 | 118 |
| 1663 | <i>S. beticus</i> /Montilla | 11,2 | 442 | 25 | 33 | 35 | 96 |
| 1693 | <i>S. montuliensis</i> /Jerez | 11,1 | 65 | 6 | 33 | 61 | 134 |
| 1697 | <i>S. montuliensis</i> /Jerez | 10,9 | 571 | 35 | 47 | 70 | 98 |

Con excepción del acetato de etilo, los ésteres juegan un papel muy favorable en el aroma afrutado de los vinos jóvenes y se consideran como responsables directos de la calidad del vino. Los acetatos más importantes de los alcoholes superiores son el acetato de isoamilo y el feniletilacetato, así como los ésteres de etilo formados por la condensación de acetil Coenzima A (Ribéreau-Gayón y col., 2000; Suárez-Lepe, 1997). Las cantidades de acetato de etilo y de acetato de isoamilo que se producen durante la fermentación dependen de la cepa de levadura, su índice de producción específica y su índice de supervivencia en vino (Plata y col., 2003). Se han descrito ciertas cepas de levaduras vínicas que producen grandes cantidades de estos compuestos, los cuales contribuyen al aroma de fermentación de los vinos jóvenes (Ribéreau-Gayón y col., 2003; Suárez-Lepe, 2002). Diferentes cepas de levadura pertenecientes

ANTECEDENTES

a la misma familia producen los mismos metabolitos de fermentación, pero en concentraciones diferentes (Estévez y col., 2004).

Majdak y col. (2002) encontraron diferencias significativas en cuanto a producción de alcoholes superiores y ésteres entre dos especies de *Saccharomyces*. Según dichos autores, *S. paradoxus* produjo menos concentraciones de alcoholes superiores (< 300 mg/L) y más de ésteres que la cepa *S. cerevisiae*, lo que se tradujo en una mayor intensidad de aroma de los vinos fermentados con la primera cepa.

Comparando cepas de levaduras comerciales de las familias *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, Estévez y col. (2004), observaron que estas últimas producían mayores cantidades de acetatos, ésteres etílicos y ácidos grasos y menores de alcoholes superiores y fenoles volátiles, resaltando las cualidades aromáticas de los vinos.

La producción de ésteres está relacionada con las actividades estererasas de la levadura, de manera que los alcoholes superiores pueden convertirse en ésteres con un aumento de la actividad esterasa (Reed y Nagodawithana, 1991). La síntesis de ésteres de acetato por las levaduras vínicas *S. cerevisiae* durante la fermentación se debe al menos a tres actividades acetiltransferasas (alcohol acetiltransferasa (AAT), etanol acetiltransferasa e isoamil AAT). Un incremento de la primera por sobreexpresión del gen alcohol acetiltransferasa (ATF1) aumenta los niveles de acetato de etilo (3 a 10 veces), acetato de isoamilo (3,8 a 12 veces), y acetato 2-feniletilo (2 a 10 veces); por contra reduce a más de la mitad la concentración de ácido acético (Lilly y col., 2000).

Actualmente, se ha puesto en evidencia que las levaduras también pueden aumentar los **aromas varietales** liberando o transformando los precursores del aroma primario procedentes de la uva. Aunque, por otra parte, los ésteres, alcoholes superiores y poliósidos producidos durante la fermentación alcohólica participan en la sensación a la nariz y a la boca

(expresión de caracteres varietales) e intervienen realzando o enmascarando las sensaciones varietales.

Numerosos autores (Zoecklein y col., 1997; Úbeda y Briones, 2000; Úbeda y col., 2000; Delfini y col, 2001; Fernández-González y col., 2004) destacan que las levaduras juegan un papel activo en la formación de aromas típicos del vino, algunos de cuyos precursores se revelan olfativamente durante el desarrollo de la fermentación. Luego, muchas de las características sensoriales de los vinos, tanto si proceden de variedades aromáticas como de variedades neutras, dependen de la cepa de levadura y, particularmente de sus actividades hidrolíticas (β -glucosidasa y otras glicosidasas).

La actividad β -glucosidasa se segrega entre la pared celular y la membrana plasmática de algunas cepas de levaduras en el transcurso de la fermentación alcohólica y es capaz de hidrolizar glicósidos terpénicos. Según Mateo y Di Stefano (1997), esta actividad se asocia con la pared celular y se encuentra en la fracción insoluble de células lisadas. Además, se induce por la presencia de enlaces β -glucosa como única fuente de energía y parece ser característica de la cepa. No todas las cepas de levaduras poseen esta actividad y en algunas de las que la poseen, es muy baja. Según Fernández-Zurbano y col. (1999), la actividad poligalacturonásica se identifica en la mayoría de las especies, mientras que la enzima β -glucosidasa está muy relacionada con la especie *Metschnikowia pulcherrima* y la proteolítica con *Pichia membranaefaciens* y *Metschnikowia pulcherrima*.

Entre las cepas con actividad β -glucosidasa más baja se encuentran las cepas más utilizadas en enología, las de la especie *S. cerevisiae*. Está demostrado que la actividad glucosídica de estas especies, por el contrario de la procedente de hongos filamentosos, no se inhibe por la presencia de glucosa; sin embargo, existen otros factores que reducen su actividad como la presencia de etanol (supone una reducción del 50% en presencia del 5% de etanol) (Mateo y Di Stefano, 1997), el pH del mosto y del vino (reducción del 33%), las

ANTECEDENTES

condiciones de aireación (reducción del 50% en condiciones anaerobias) e incluso la temperatura de fermentación (reducción del 40%) (Hernández y col., 2002).

Una de las cepas que más actividad glicosídica presenta es la cepa FY-102 de la especie *Pichia anomala*. Esta cepa se considera antagonista de los síntomas de podredumbre gris ocasionados por *B. cinerea* y no sólo presenta un productividad específica β -glucosidasa extremadamente alta, sino que también presenta actividad arabinosidasa. Por el contrario de otras especies, su actividad β -glucosidasa se induce a las concentraciones de etanol presentes normalmente en el vino y no se inhibe en presencia de glucosa ni de fructosa, presentando una temperatura óptima de 20°C y gran estabilidad en soluciones vínicas (Spagna y col., 2002b).

Fernández-González y col. (2003), ponen en evidencia que las especies de levaduras vínicas no-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora uvarum*) son un origen potencial de glicosidasas; sin embargo, destacan la alta actividad glicosidasa de la especie *Candida molischiana* (no vínica) capaz de hidrolizar glicósidos de *Moscatel* con mayor intensidad incluso que el preparado enzimático Pectinol HS (Genecor).

Zea y col. (1995a), señalan que, durante la fase de crecimiento, las levaduras sintetizan compuestos terpénicos que usan como intermedios biosintéticos para la síntesis de esteroides. Una vez inhibida dicha síntesis por ausencia de oxígeno, se produce una acumulación de estos intermedios y las levaduras los excretan al medio en diferente medida dependiendo de la cepa en concreto. Así, *S. cerevisiae* excreta más geraniol y α -terpineol, mientras que *S. capensis* excreta más linalol.

Por otra parte, durante la fermentación alcohólica pueden tener lugar una reorganización de los compuestos aromáticos liberados. Así, ciertos monoterpenos volátiles pueden reorganizarse como resultado de una serie de fenómenos entre los que se incluyen las conversiones, formación de óxidos terpénicos, fijación a moléculas de CO₂ y posterior arrastre

durante la fermentación, hidrólisis química y enzimática, e incluso absorción a las paredes celulares de las levaduras (Darriet, 1992 recogido por Zea y col., 1995b).

King y Dickinson (2000), describen la capacidad de biotransformar monoterpenoles de las especies *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Torulaspora delbrueckii*, destacando que las tres cepas forman linalol a partir de geraniol y nerol, y producen α -terpineol a partir de linalol y nerol; sin embargo, sólo las dos primeras reducen geraniol a citronelol. Luego la cantidad de geraniol y citronelol existente en el medio al final de la fermentación está determinada por la cepa de levadura (Moruno y col., 2002).

En la mayoría de las bodegas modernas se usan preferiblemente las LSA que, además de la función primaria de catalizar la rápida, eficiente y completa conversión de los azúcares a alcohol sin el desarrollo de “malos” aromas, presentan un amplio rango de propiedades especializadas que pueden añadir valor al producto final (Pretorius, 1999). Por este motivo, la generalización de las prácticas de adición de levadura, en el transcurso de estos últimos veinte años, ha coincidido con un aumento muy importante del número de cepas de levaduras enológicas puestas a disposición de los tecnólogos. Mientras que los criterios de selección tomados en cuenta inicialmente afectaban esencialmente al acabado de la fermentación y la ausencia de defectos organolépticos, en estos últimos años, se asiste a la comercialización de cepas que responden a exigencias mucho más precisas, seleccionadas según nuevos objetivos (cepas aromáticas, acidificantes, fuerte formación de glicerol o débil de ácido acético, resistencia a temperaturas elevadas, poder alcohólico, fermentación del ácido málico, etc.). Concretamente, cuando se quieren obtener vinos sin defectos y con los mejores aromas se buscan y seleccionan cepas que tienen el mejor aroma fermentativo y que producen gustos más deseados (ésteres o acetatos, que producen matices afrutados) al mismo tiempo que reduzcan la producción de otros (alcoholes superiores y fenoles volátiles) que contribuyen negativamente en el aroma final del vino; todo ello sin modificar la composición química global de los vinos.

En un principio, esta búsqueda de cepas de levaduras vínicas con funciones específicas condujo a la selección de levaduras. Sin embargo, sólo un número limitado de características son susceptibles de ser mejoradas por selección. La intervención de la ingeniería genética permite ampliar el campo de posibilidades, por introducción de aptitudes que no se encuentran en las poblaciones indígenas e incluso propiedades no existentes en la levadura, o por modificación del nivel de intensidad de las propiedades naturales.

De esta forma, las características genéticas de una levadura vínica pueden ser modificadas según las necesidades de la industria vitivinícola en base a técnicas clásicas como la selección clonal, la inducción y selección de mutantes, la hibridación y fusión de protoplastos y la transformación (Mesas y Alegre, 1999; Pretorius, 2000). Sin embargo, según recoge Pretorius (2000) la aplicación de las técnicas de DNA recombinante es más sencilla y precisa y es posible construir cepas que expresen actividades metabólicas de interés o que ejerzan efectos beneficiosos en las características organolépticas de los vinos. Sin embargo, en la mayoría de los casos los resultados no han sido satisfactorios desde el punto de vista industrial, pero han permitido avanzar en el conocimiento de los genomas de estas levaduras industriales (Ramón, 2005).

Atendiendo a estas técnicas, Querol (2000), cita numerosos ejemplos de la aplicación de ingeniería genética en enología. Entre ellos destaca el diseño de levaduras vínicas que contienen genes que codifican los factores *killer* K1 y K2 siendo resistentes a estos factores *killer*. También describe la construcción de cepas de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae* que, al expresar el gen de la L-(+)-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei*, pueden llevar a cabo una fermentación mixta (lactoalcohólica) y solventar el problema de baja acidez de los vinos de regiones cálidas. Recientemente se ha conseguido una vía eficaz de degradación de málico en *S. cerevisiae*. Para ello se ha construido una levadura recombinante que porta un gen de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, que codifica una malato permeasa y el gen de *L. lactis* que codifica el enzima málico.

Otro ejemplo interesante del uso de las técnicas de ingeniería genética en enología lo constituye la construcción de levaduras vínicas recombinantes que expresan genes que codifican celulasas y hemicelulasas. En las bodegas se adicionan estos enzimas para solventar problemas de filtración o incrementar aromas afrutados, pero la heterogeneidad de las preparaciones comerciales (una mezcla de enzimas que varía según el lote) hace de su uso algo impredecible. Querol (2000) y su grupo han construido diversas levaduras vínicas recombinantes en su laboratorio que contienen genes de hongos filamentosos que codifican beta-(1,4)-endoglucanasa, alfa-L-arabinofuranosidasa, beta-glucosidasa, endoxilanasas y alfa-ramnosidasas. Todas estas levaduras son capaces de secretar los enzimas correspondientes al mosto en cantidades suficientes para llevar a cabo el proceso tecnológico y producir vino con adecuadas características organolépticas. También se ha desarrollado una levadura recombinante que contiene un gen fúngico que codifica una pectato liasa útil para solventar problemas de filtración.

Manzanares y col. (2003) realizaron microvinificaciones con una combinación de una cepa industrial modificada genéticamente para expresar ramnosidasa y con otra cepa que expresaba β -glucosidasa obteniendo un aumento considerable de linalol.

Sin embargo, de forma generalizada, las levaduras se comportan de forma muy distinta en condiciones de laboratorio o en vinificación, incluso se pueden observar diferencias según la variedad de mosto a fermentar.

Según Querol (2000), los principales temas de mejora genética desarrollados hasta la fecha pueden ser reagrupados en dos problemáticas, que se corresponden con las mayores preocupaciones del sector. La primera se refiere a la simplificación de procesos de fermentación y la segunda a la mejora de la calidad de los productos. Según Pretorius y Bauer (2002) estas mejoras incluirían el aumento de la eficacia del proceso de fermentación, del procesado del vino y del control de su degradación microbiológica y, además realzarían su salubilidad y calidad sensorial (Tabla 11).

Estas levaduras modificadas por técnicas de ingeniería genética son organismos transgénicos y su uso a nivel industrial implicaría la elaboración de vinos transgénicos. Y, a pesar de que los organismos modificados genéticamente parecen ofrecer numerosas ventajas a la industria enológica, así como a otras industrias de la alimentación, son muchos los problemas relacionados con la aceptación de alimentos modificados genéticamente (OMG), principalmente en la Unión Europea.

En la actualidad existe gran escepticismo por parte de los consumidores sobre los organismos y productos modificados genéticamente (productos GMOs y GM), lo que hace que los OMG estén sometidos a una reglamentación muy estricta y que muchos de ellos ni se comercialicen. De hecho en muchos casos se necesita de autorización para este tipo de investigaciones y es indispensable que los fragmentos de ADN introducidos en levadura provengan de microorganismos GRAS, y preferentemente de microorganismos presentes en el vino de forma natural.

En España, si se desea comercializar un vino elaborado con una levadura transgénica, su evaluación y posible autorización de comercialización estaría sometida a una normativa jurídica (Directiva 2001/18 de la UE sobre “liberación intencional de organismos modificados genéticamente” transpuesta a la legislación española en la nueva Ley 9/2003) que regula la investigación, la liberación al ambiente, la patentabilidad, la comercialización y el etiquetado de los alimentos transgénicos obtenidos por ingeniería genética. Es un proceso largo (una media de 5 años) y costoso en el cual la evaluación se lleva a cabo por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Ministerio de Medio Ambiente) y la Comisión Nacional de Biovigilancia (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (Ramón, 2005).

Debido a esta problemática, la aplicación de la tecnología genética, tanto en la industria vitivinícola como en otras industrias alimentarias, no es muy viable en el presente, sin embargo, ofrece un impresionante potencial futuro (Pretorius y Bauer, 2002).

Tabla 11. Mejoras que se pueden conseguir mediante el uso de levaduras vínicas modificadas genéticamente (Pretorius y Bauer, 2002).

| Desirable properties | Focus areas | Examples of potential target genes* |
|--|--|--|
| Improved fermentation performance | | |
| Improved general resilience and stress tolerance | Stress response, sterol, glycogen and trehalose accumulation | Modification of glycogen or trehalose metabolism (e.g. acting on <i>GSY1</i> and <i>GSY2</i> , <i>TPS1</i> and <i>TPS2</i>) |
| Improved efficiency of sugar utilization | Hexose transporters, hexose kinases | Overexpression and modification of <i>HXT1-HXT18</i> , <i>SNF3</i> , <i>FSY1</i> and use of heterologous transporters and kinases |
| Improved efficiency of nitrogen assimilation | Improved utilization of less efficient N sources | Proline catabolism (<i>PUT1</i> and <i>PUT2</i>) and use of heterologous catabolic genes |
| Improved ethanol tolerance | Sterol formation, membrane ATPase activity | Modification of the expression of <i>PMA1</i> and <i>PMA2</i> (ATPase), sterol anabolic sterol anabolic genes |
| Increased tolerance to antimicrobial compounds | Resistance to killer toxins, sulfur dioxide, agrochemicals | Inclusion of <i>KIL2</i> , overexpression of <i>CUP1</i> |
| Reduced foam formation | Cell-surface proteins | Deletion of <i>FRO1</i> and <i>FRO2</i> |
| Improved processing efficiency | | |
| Improved protein clarification | Proteases | Overexpression of <i>PEP4</i> and secretion of other proteases |
| Improved polysaccharide clarification | Glucanases, pectinases, xylanases, arabinofuranosidases | Overexpression of <i>END1</i> , <i>EXG1</i> , <i>CEL1</i> , <i>BGL1</i> , <i>PEL5</i> and <i>PEH1</i> , <i>XYN1-5</i> , <i>ABF2</i> |
| Controlled cell sedimentation and flocculation | Flocculins | Late expression of flocculation genes (<i>FLO1</i> , <i>FLO5</i> , <i>MUC11FLO11</i>) under control of promoters (<i>HSP30</i>) imparting desired expression |
| Controlled cell flotation and flor formation | Cell-wall hydrophobic proteins | Late expression of <i>MUC11FLO11</i> under control of promoters (<i>HSP30</i>) imparting desired expression pattern |
| Improved biological control of wine spoilage microorganisms | | |
| Wine yeasts producing antimicrobial enzymes | Lysozyme, glucanases, chitinases | Expression of <i>HEL1</i> , <i>CTS1</i> , <i>EXG1</i> and other antimicrobial enzymes |
| Wine yeasts producing antimicrobial peptides | Bacteriocins | Expression of <i>PED1</i> , <i>LCA1</i> and other heterologous bacteriocin and zymocin genes |
| Wine yeasts producing sulfur dioxide | Sulfur metabolism and sulfur dioxide formation | Overexpression of <i>MET14</i> and <i>MET16</i> and deletion of <i>MET10</i> |
| Improved wine wholesomeness | | |
| Increased production of resveratrol | Stilbene synthesis | Expression of <i>4CL9/216</i> , <i>VST1</i> |
| Reduced formation of ethyl carbamate | Amino acid metabolism, urea formation | Deletion of <i>CAR1</i> or expression of <i>URE1</i> |
| Reduced formation of biogenic amines | Bacteriolytic enzymes, bacteriocins | Expression of <i>HEL1</i> , <i>PED1</i> , <i>LCA1</i> and other bacteriocins |
| Decreased levels of alcohol | Carbon flux, glycerol metabolism and glucose oxidation | Overexpression of <i>GPD1</i> and <i>GPD2</i> , modification of <i>FPS1</i> , expression of <i>GOX1</i> |
| Improved wine flavour and other sensory qualities | | |
| Enhanced liberation of grape terpenoids | Glycosidases, glucanases, arabinofuranosidases | Overexpression of <i>END1</i> , <i>EXG1</i> , <i>CEL1</i> , <i>BGL1</i> , <i>PEL5</i> and <i>PEH1</i> , <i>ABF2</i> |
| Enhanced production of desirable volatile esters | Esterases | Modified expression of <i>ATF1</i> and other alcohol transferases, <i>IAH1</i> and other esterases |
| Optimized fusel oil production | Amino acid metabolism | Deletion of the <i>ILE</i> , <i>LEU</i> and <i>VAL</i> genes |
| Enhanced glycerol production | Glycerol metabolism | Overexpression of <i>GPD1</i> and <i>GPD2</i> , <i>FPS1</i> , and deletion of <i>ALD6</i> |
| Bioadjustment of wine acidity | Malolactic and malolactic fermentation, lactic acid production | Expression of <i>MAE1</i> , together with <i>MAE2</i> or <i>mleS</i> , or <i>LDH1</i> |
| Optimization of phenolics | Phenolic acid metabolism | Modified expression of <i>PAD1</i> , <i>pdC</i> , <i>padC</i> |
| Reduced sulfite and sulfide production | Sulfur metabolism, hydrogen sulfide formation | Deletion of <i>MET14</i> and <i>MRX1</i> |
| *Abbreviations : <i>4CL9/216</i> , coenzyme A ligase; <i>ABF2</i> , arabinofuranosidase; <i>ATF2</i> , alcohol acetyl transferase; <i>BGL1</i> , β -glucosidase, cellobiase; <i>CAR1</i> , arginase; <i>CEL1</i> , cellodextrinase; <i>CTS1</i> , chitinase; <i>CUP1</i> , copper chelatin; <i>END1</i> , endoglucanase; <i>EXG1</i> , exoglucanase; <i>FPS1</i> , glycerol transport facilitator; <i>FRO</i> , froth protein; <i>GOX1</i> , glucose oxidase; <i>GPD</i> , glycerol-3-phosphate dehydrogenase; <i>GSY</i> , glycogen synthase; <i>HEL1</i> , hen egg white lysozyme; <i>IAH1</i> , esterase; <i>KIL2</i> , zymocin and immunity factor; <i>LCA1</i> , leucocin; <i>LDH1</i> , lacticodehydrogenase; <i>MAE1</i> , malate permease; <i>MAE2</i> , malic enzyme; <i>MRX1</i> , methionine sulfoxide reductase; <i>MET10</i> , sulfite reductase; <i>MET14</i> , adenosylphosphosulfate kinase; <i>MET16</i> , phospho adenosylphosphosulfate reductase; <i>mleS</i> , malolactic enzyme; <i>PAD1</i> , phenyl acrylic acid decarboxylase; <i>padC</i> , phenolic acid decarboxylase; <i>pdC</i> , p-coumaric acid decarboxylase; <i>PED1</i> , pediocin; <i>PEH1</i> , polygalacturonase; <i>PEL5</i> , pectate lyase; <i>PEP4</i> , protease A; <i>PUT1</i> , proline oxidase; <i>PUT2</i> , pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; <i>TPS1</i> , trehalose-6-phosphate synthase; <i>TPS2</i> , trehalose-6-phosphate phosphatase; <i>URE1</i> , urease; <i>VST1</i> , stilbene synthase; <i>XYN</i> , xylanases. | | |

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. PROTOCOLO DE TRABAJO

Todos los ensayos se realizaron durante dos campañas, con uva y mosto de las variedades *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* obtenidas de parcelas pertenecientes a la zona de Cádiz. Concretamente, la uva utilizada en los ensayos de maceración pelicular y supraextracción fue suministrada por el C.I.F.A. “Rancho de la Merced” de Jerez de la Frontera y por Bodega Cooperativa Unión de Viticultores Chiclaneros (Chiclana de la Frontera). Asimismo, el mosto empleado se obtuvo de las bodegas del Grupo Osborne situadas en El Puerto de Santa María y también de la ya citada cooperativa de Chiclana.

IV.1.1. PROCEDIMIENTOS COMUNES DE ELABORACIÓN

En todos los ensayos se siguió el mismo proceso de elaboración para posteriormente comparar las distintas alternativas propuestas. En la Fig.11 se representan las operaciones comunes en todos los ensayos destacando en color rojo las distintas alternativas aplicadas y el momento de su aplicación así como el número de tomas de muestra realizadas y la etapa en la que se realizaron (en azul).

1.1.1. Molturado-despalillado

Excepto en los ensayos en los cuales se partió de mosto suministrado por las distintas bodegas, en los demás casos el proceso de elaboración comenzó con la recepción de la uva (aproximadamente unos 40 Kg para cada ensayo) en el laboratorio y a continuación se procedió con la operación de molturado-despalillado.

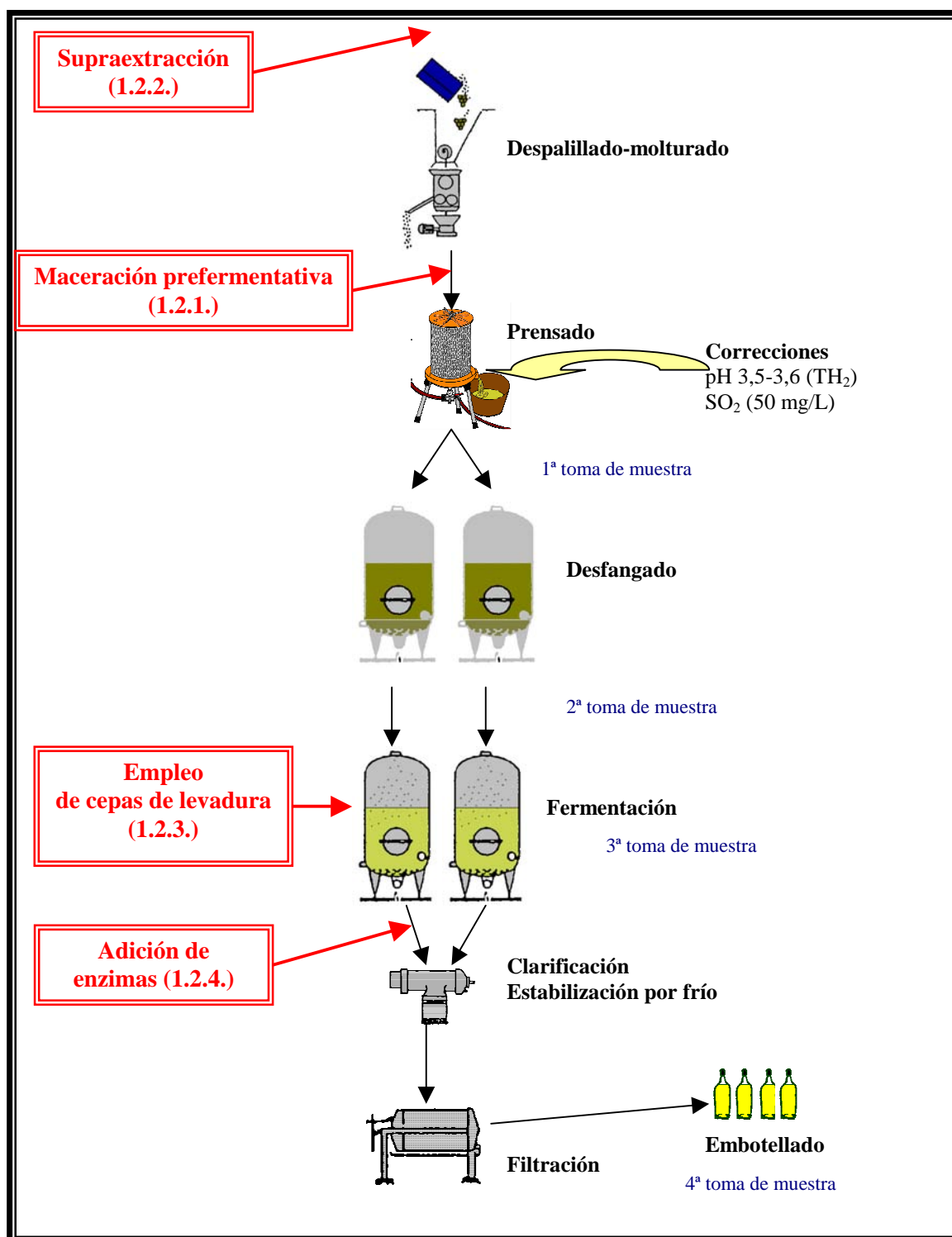


Fig. 11. Esquema general de elaboración de los vinos de ensayo

La uva se recogió entre los primeros días de vendimia y, una vez en el laboratorio, fue molturada y despalillada utilizando una despalilladora-molturadora de 1000 Kg/h de capacidad.

1.1.2. Prensado

Una vez molturada la uva se procedió a su prensado, para lo cual se utilizó una hidroprensa de 25 Kg de capacidad fabricada por ENOTECNICA PILLAN SNC (Camisano, Italia). La prensa consta de una jaula perforada de acero inoxidable AISI 304 con agujeros de 2 mm de diámetro y una membrana de caucho que se hincha y ejerce una presión mediante agua de la red. En todos los casos se aplicó una presión de hasta 3 Kg, realizando dos despresurizaciones (vaciando el agua de la membrana) para remover la masa y agotar el mosto.

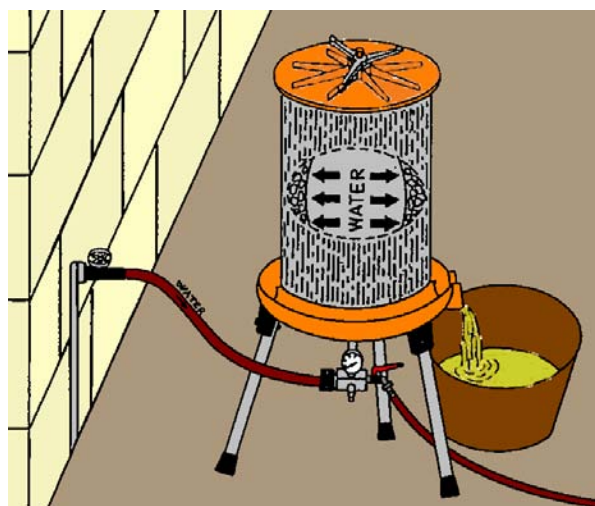


Fig.12. Esquema de la hidroprensa PILLAN

1.1.3. Correcciones prefermentativas

Una vez obtenido el mosto se tomó una muestra para determinar el grado Beaumé (°Bè), el pH y la acidez total. A partir de estos datos se realizó la corrección del pH hasta 3,5-3,6 por adición de ácido tartárico (1 g/L por cada 0,2 unidades de pH) y se adicionó anhídrido sulfuroso (en forma de metabisulfito sódico) a razón de 50 mg/L.

1.1.4. Desfangado

Se realizó un desfangado estático a 20°C de temperatura, durante 24 horas en depósitos de metacrilato cúbicos de 3 L de capacidad.

1.1.5. Fermentación

Una vez separados los fangos, el mosto se trasegó a fermentadores de vidrio de 5 L de capacidad con una camisa de refrigeración por la que se hace recircular agua a baja temperatura. Dichas camisas se encuentran conectadas a un intercambiador de calor modelo LAUDA WKL 700, que permitió el control de temperatura durante la fermentación alrededor de los 18°C (Fig. 13).



Fig. 13. Fotografía de los fermentadores y equipo de intercambio de calor utilizado en los ensayos.

La cepa de levadura utilizada como referencia en todos los ensayos fue cepa levadura enológica comercial *Saccharomyces cerevisiae* (FERMIVIN: cepa nº 7013 seleccionada de Corbières por el INRA de Narbona) suministrada por DSM Food Specialties Spain, S.L. (Barcelona, España). Según los datos técnicos suministrados por el distribuidor, dicha cepa se

caracteriza por producir bajos niveles de acidez volátil, acetaldehído, alcoholes superiores y compuestos azufrados.

La dosis empleada en la preparación del inóculo fue la recomendada en las especificaciones del producto (20 g/hL) y la rehidratación se llevó a cabo siguiendo el protocolo especificado (a 35°C con una mezcla de agua-mosto).

1.1.6. Clarificación, filtración y embotellado

Una vez finalizada la fermentación, los vinos se dejaron reposar en los mismos fermentadores durante una semana. Durante este tiempo, la temperatura del fermentador se bajó a 6°C para facilitar el deslío. Tras ese tiempo se sacaron los claros y se pasaron a través de un filtro de placas de 5L de capacidad fabricado por SECOVISA HERPASUR a escala laboratorio. Para la filtración se utilizaron placas filtrantes esterilizantes SA-990 (Papeleras del Besós Placas filtrantes, S.L., Barcelona, España) y el vino se hizo pasar a través del mismo por corriente de nitrógeno sin superar 1 bar de presión.

Posteriormente los vinos se embotellaron y taponaron previa eliminación de oxígeno del medio por corriente de nitrógeno. Se conservaron en frigorífico (6°C) durante varios meses hasta la realización de las catas y los análisis fisicoquímicos finales.

IV.1.2. PROCEDIMIENTOS EPECÍFICOS DE ELABORACIÓN

1.2.1. Ensayos de maceración pelicular

Tras el molturado y despalillado de la uva se separaron las fracciones de mosto y hollejo para después dividir cada una de ellas en cuatro fracciones iguales. Posteriormente,

MATERIAL Y MÉTODOS

cada fracción de mosto se mezcló con una de hollejo en relación 1:3 (1 L de mosto y 3 Kg de hollejo).

Cada una de las mezclas se introdujo en un depósito refrigerado de 5 L de capacidad en donde se realizaron las maceraciones a temperatura controlada de 15°C. En cada uno de los depósitos se mantuvo en contacto el mosto con el hollejo un tiempo determinado, de manera que los tiempos de maceración fueron 0, 4, 8 y 12 horas respectivamente para cada depósito.

Tras las maceraciones, cada una de las fracciones se sometió sucesivamente a las operaciones de prensado, desfangado, fermentación y clarificación siguiendo el procedimiento común explicado en el apartado IV.1.1.

1.2.2. Ensayos de supraextracción

Para los ensayos de supraextracción se partió de las mismas partidas de uva (procedentes de las mismas parcelas y recibidas el mismo día) que para los ensayos de maceración pelicular con la única diferencia de que se tomaron aproximadamente 15 Kg del total de la uva recibida para cada variedad (*Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*) y se congelaron en un congelador modelo CROSI a una temperatura de -18°C.

1.2.3. Ensayos de empleo de cepas de levadura específicas

Para los ensayos con las cepas de levadura se utilizó mosto de uva de ambas variedades, sin corregir, obtenido de manera industrial en las empresas suministradoras. Las características generales de dichos mostos fueron las siguientes:

Tabla 12. Características generales de los mostos industriales de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

| | <i>Palomino fino</i> | <i>Moscatel de Alejandría</i> |
|--|----------------------|-------------------------------|
| Bé | 11,2 ± 0,1 | 12,3 ± 0,1 |
| pH* | 3,54 ± 0,01 | 3,76 ± 0,01 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 4,30 ± 0,20 | 5,60 ± 0,05 |
| Turbidez (NTU) antes | 1865 ± 100 | 4714 ± 210 |
| Turbidez (NTU) después | 1221 ± 75 | 191 ± 5 |
| N. asimilable (mg/L) | 123,2 ± 4,3 | 228,2 ± 6,4 |

* Tras la corrección de pH con ácido tartárico

Para el mosto de la variedad *Palomino fino* se llevó a cabo una corrección de pH, que inicialmente se encontraba a 3,75, mediante la adición de ácido tartárico de uso industrial. Posteriormente se realizó la adición de metabisulfito sódico a dosis de 50 mg/L. En el caso del mosto de la variedad *Moscatel* no se realizó corrección de pH y tampoco se adicionó sulfuroso puesto que dicho mosto había sido previamente corregido a dosis de 200 mg/L.

Las correcciones y el desfangado se realizaron en un depósito de 25 L atemperado a 20°C (24 horas desfangado). Tras dichas operaciones el mosto se dividió en cuatro fracciones de 4,5 L que se pasaron a los depósitos de fermentación ya utilizados en ensayos previos. Se utilizaron cuatro cepas de levadura inoculando cada depósito con una de ellas. De las cuatro cepas utilizadas, tres fueron cepas comerciales y la cuarta, una cepa *Saccharomyces cerevisiae* aislada por las Bodegas A. Domecq, S.L. (Jerez de la Frontera) y utilizada normalmente como “pie de cuba”.

En el caso del “pie de cuba”, el inóculo se preparó por resiembra de la levadura en un pequeño volumen de mosto (inóculo madre) y posterior adición de éste al fermentador. Las tres cepas comerciales utilizadas fueron: FERMIVIN (DSM Food Specialties Spain, S.L., Barcelona, España), que se utilizó como referencia, y las cepas ENSIS-L5 y CK S-102 (estas últimas suministradas por Nutritec).

La cepa FERMIVIN se utilizó a igual dosis y siguiendo el mismo protocolo que en ensayos anteriores. Las cepas ENSIS-L5 y CK S-102 se utilizaron en las dosis y según las recomendaciones de sus instrucciones de uso (la primera a 10 g/hL y la segunda a 15 g/hL). Según dichas especificaciones la LSA ENSIS-L5 es una cepa seleccionada *S. cerevisiae bayanus* caracterizada por fermentar a bajas temperaturas y respetar las características varietales (una cepa neutra), mientras que la LSA CK S-102 es una cepa seleccionada *S. cerevisiae cerevisiae* caracterizada por su factor killer (fenotipo K2) y elevada producción de ésteres a baja temperatura.

1.2.4. Ensayos de adición de enzimas

Una vez finalizada la fermentación y separados los fangos de los vinos elaborados con las diferentes cepas de levaduras, el volumen de claros de cada fermentador se dividió en dos fracciones. Una de ellas se clarificó con bentonita a razón de 40 g/hL y posteriormente se filtró y embotelló. La otra fracción se mantuvo en depósitos de clarificación durante dos semanas a temperatura de 20°C tras la adición de extractos enzimáticos con alta actividad β -glucosidasa. Tras ese periodo de tiempo los vinos se clarificaron con bentonita, para detener la actividad enzimática, y se filtraron y embotellaron siguiendo los procedimientos comunes.

Las enzimas comerciales empleadas fueron Novoferm 12G (Novo Nordisk) y Rapidase AR-2000 (DSM Food Specialties). Ambos extractos con alta actividad pectinasa y β -glucosidasa. Las dosis empleadas de cada una de ellas fueron 4 y 2,5 g/hL respectivamente.

1.2.4.1. Determinación de la actividad enzimática

Según datos suministrados por DSM Food Specialties, la actividad β -glucosidasa del extracto enzimático es de 5900 BDG/g de extracto, sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo dicha actividad podía verse reducida por el pH. Además, puesto que del extracto

Novoferm 12G no se poseían datos de actividades enzimáticas se decidió determinar la actividad β -glucosidasa en cada uno de los extractos para las condiciones de estudio.

Para la determinación de dicha actividad se siguió el método propuesto por Martino y col. (1996) con algunas modificaciones. Se adicionaron 50 μ L de extracto enzimático disuelto en tampón citrato-fosfato a pH 3.3 (Sigma-Aldrich) a 450 μ L de disolución 5.5 mM de *p*-nitrofenil β -D-glucopiranosido en el mismo tampón (*p*-NPG, Sigma-Aldrich). La reacción tuvo lugar a temperatura constante de 25°C durante 10 minutos y se detuvo añadiendo 1 mL de disolución 1 M de Na_2CO_3 , lo que permitió que se desarrollara el color amarillo del ión *p*-nitrofenolato. La absorbancia de las muestras se midió a 400 nm en un espectrofotómetro UV-Visible HITACHI modelo U-2001 (PACISA Y GIRALT, SL, Grupo Taper, Madrid, España), utilizando un valor de ϵ de $18.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Los resultados obtenidos fueron de 33,67 y 38,61 unidades/g de extracto para NOVOFERM 12G y RAPIDASE AR2000 respectivamente.

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE UVAS, MOSTOS Y VINOS

En todos los ensayos se realizaron básicamente cuatro tomas de muestra tal y como se indica en la Fig.11. Previamente a la primera toma de muestra se realizaron las correcciones de pH y anhídrido sulfuroso, para lo cual se tuvo que coger una muestra inicial tras el prensado y posteriormente a dichas correcciones.

Excepto determinaciones específicas para muestras determinadas, como por ejemplo la caracterización de los hollejos, los análisis realizados en cada toma de muestras fueron los siguientes:

1ª toma de muestras: grado Beaumé (°Bè), pH, acidez total y turbidez (NTU). Para los ensayos de maceración pelicular y supraextracción también se realizó un recuento de partículas.

2ª toma de muestras: turbidez, recuento de partículas (sólo para maceración pelicular y supraextracción), glicerina, ácido málico, ácido glucónico, abs 280 y 470 nm, cationes (Na, K, Fe, Cu, Zn y Mg) y nitrógeno asimilable.

3ª toma de muestras: densidad y biomasa (viable, no viable y total).

4ª toma de muestras: densidad, grado alcohólico, acidez total, acidez volátil, pH, color, abs 280 y 470 nm, glicerina, azúcares residuales y cationes.

IV.2.1. CARACTERIZACIÓN DE UVAS

2.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En los ensayos correspondientes a la aplicación de supraextracción se estudiaron los cambios microestructurales producidos en el hollejo durante la congelación-descongelación de la uva. Para ello se recurrió a la técnica SEM (Scanning Electron Microscopy) utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo FIE QUANTA 200 (Philips) de la División de Microscopía Electrónica del Servicio Central de Ciencia y Tecnología (Universidad de Cádiz) (Fig. 14).

La preparación de las muestras se realizó siguiendo la metodología propuesta por Mafrá y col. (2001) adaptándola al tipo de muestra. Los hollejos fueron separados de los granos y posteriormente troceados en pequeños cuadrados (0,5 x 0,5 mm) cada uno de los cuales se colocó en un pellet. Con un alfiler se marcó la cara interna o externa del hollejo para

después identificarla durante el tratamiento. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón de cacodilato 0,05M (pH 7,2) el cual se dejó actuar durante una hora. Transcurrido ese tiempo se realizó un lavado con el mismo tampón de cacodilato retirando el glutaraldehído del medio sin tocar las muestras. Posteriormente se realizaron dos lavados más, de 10 min cada uno, con el mismo tampón y se procedió a la deshidratación de las muestras previamente al secado al punto crítico. La deshidratación consistió en sucesivos lavados (media hora cada uno) con distintas concentraciones de acetona (70, 90, 100 y 100%). Los tejidos secos se colocaron en unos “pocillos” de aluminio en la posición deseada (según la cara a examinar), se llevaron a punto crítico y se metalizaron con oro (25 nm de grosor) durante 100-150s. Posteriormente las muestras se examinaron y fotografiaron con el microscopio óptico indicado anteriormente.

El secado al punto crítico se realizó con un Critical Point Dryer BALEERS modelo CPD 030 y el metalizado con un Sputter coater modelo SCE 004 (BALLERS, Liechtenstein). Ambas operaciones fueron realizadas por personal técnico especializado de la División de Microscopía Electrónica del SCCYT de la Universidad de Cádiz.



Fig.14. Equipo SEM QUANTA 200 del SCCYT de la Universidad de Cádiz.

IV.2.2. CARACTERIZACIÓN DE MOSTOS

2.2.1. Análisis general de las muestras

Al mosto obtenido del prensado se determinó el grado Beaumé, el pH y la acidez total. Una vez realizadas las correcciones prefermentativas se determinó la turbidez y se realizó un recuento de partículas (antes y después del desfangado). Tras el desfangado se determinaron nuevamente el pH, la acidez total, las absorbancias a 280 y 470 nm, los ácidos málico y glucónico, los cationes y el nitrógeno asimilable.

Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.1.1. Determinación del grado Beaumé

Para la determinación del °Bé se utilizaron 250 mL de mosto obtenido tras el prensado, en una probeta termostatzada a 15°C, mediante areometría, con areómetros calibrados Dujardin-Salleron (Laboratoires Dujardin-Salleron, Francia).

2.2.1.2. Determinación del pH

El pH se determinó mediante medida directa sobre la muestra, utilizando un pHmetro digital micro-pHmetro 2001 CRISON (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España) provisto de electrodo selectivo (Cat. 52-02, CRISON) y compensador automático de temperatura.

2.2.1.3. Determinación de la acidez total

La determinación de acidez total se realizó por volumetría utilizando el método propuesto por García (1990). Se tomaron 25 mL de muestra, que se valoraron con NaOH

factorizada 0,1N hasta $\text{pH} \geq 7,00$ (valoración potenciométrica), utilizando fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresaron en g/L de ácido tartárico según la siguiente expresión:

$$\text{Acidez total (g/L TH}_2\text{)} = N_B \cdot V_B \cdot M_{\text{EQ}} / V_V$$

Donde N_B y V_B son la normalidad y el volumen de sosa gastados respectivamente, V_V el volumen de muestra utilizado en el análisis y M_{EQ} es la masa equivalente del ácido tartárico (75 g/eq).

2.2.1.4. Determinación de la turbidez

La turbidez se determinó por nefelometría (NTU) con un equipo 2100AN (HACH COMPANY, Loveland, USA).

2.2.1.5. Determinación de absorbancias a 280 y 470 nm

Las medidas de absorbancia a 280 y 470 nm se determinaron con un espectrofotómetro UV-Visible HITACHI modelo U-2001 (PACISA Y GIRALT, SL, Grupo Taper, Madrid, España). Las determinaciones se realizaron por medida directa de la muestra previamente filtrada a través de filtros de jeringa Acrodisc® (PALL Corporation, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España) de 25 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro.

2.2.1.6. Determinación de ácido málico y ácido glucónico

El contenido en ácido málico y ácido glucónico se determinó por métodos enzimáticos utilizando los métodos UV para la determinación de ácido L-málico y ácido D-glucónico de Boehringer Mannheim (R-Biopharm, Alemania). Estos test se basan en medidas

espectrofotométricas a 340 nm en las cuales las cantidades de ácido málico y ácido glucónico vienen dadas en función de las cantidades de NADH y NADPH formados durante la reacción, respectivamente. Dichas medidas se realizaron con un espectrofotómetro UV-Visible HITACHI modelo U-2001 (PACISA Y GIRALT, SL, Grupo Taper, Madrid, España).

2.2.1.7. Determinación de cationes

La determinación de cationes (Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu y Zn) se realizó por absorción atómica con un espectrofotómetro de AA PYE-UNICAM modelo SP9 (Philips Ibérica, Holanda). El Fe, Cu, Zn, Ca y Mg se determinaron por absorción y el Na y K por emisión. Las condiciones de trabajo aparecen reflejadas en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de trabajo empleadas para las medidas por AA de los diferentes cationes.

| Elemento | λ (nm) | Bandpass (nm) | Intensidad (mA) |
|----------|----------------|---------------|-----------------|
| Fe | 248,3 | 0,2 | 7 |
| Cu | 324,8 | 0,5 | 7 |
| Zn | 213,9 | 0,5 | 7 |
| Ca | 422,7 | 0,2 | 5 |
| Mg | 285,2 | 0,5 | 5 |
| Na | 589,0 | 0,2 | - |
| K | 766,0 | 0,5 | - |

Para llevar a cabo las calibraciones del equipo se utilizaron patrones preparados a partir de una disolución “madre” de cada uno de los elementos a concentración de $1 \pm 0,002$ g/L calidad AA, (Panreac Química SA, Barcelona, España).

2.2.1.8. Determinación de nitrógeno asimilable

La cantidad de nitrógeno asimilable de los mostos se determinó según la metodología propuesta por Aerny (1997) y recogida por Zamora (2003). El procedimiento seguido fue el

descrito a continuación: se colocaron 25 mL de muestra en un vaso de precipitados y se le añadieron unas gotas de agua oxigenada para eliminar restos de sulfuroso. Posteriormente se neutralizaron hasta pH 8,01 con NaOH 0,25M y se le adicionaron 10 mL de formaldehído (35% a pH 8,01). Se esperó un minuto exacto (según indica la metodología) y se valoró con NaOH 0,25M hasta pH 8,01. El nitrógeno asimilable se determinó en función del volumen de NaOH gastado (V) según la ecuación:

$$\text{Nitrógeno asimilable (mg/L)} = 140 \cdot V$$

2.2.2. Análisis específicos para muestras de maceración pelicular y supraextracción

2.2.2.1. Recuento de partículas por tamaño

El fundamento del recuento de partículas por tamaño consiste en hacer circular una muestra en la trayectoria de un rayo láser de manera que éstas interfieren la medida de un sensor situado frente al emisor.

Para llevar a cabo el recuento se empleó un equipo PARTICLE MEASURING SYSTEM, INC (BOULDER, Colo, USA) (Fig.15) consistente en un muestreador de jeringa para líquidos con contador de partículas óptico LiQuilaz para diferentes sensibilidades de tamaño (de 0,2 a 100 μm) y software SamplerSight.

Las medidas se realizaron por cuadruplicado, utilizando 10 mL de mosto para cada una, a distintos intervalos de tamaño de partícula entre 2 y 100 μm (2-5, 5-10, 10-20, 20-40, 40-50, 50-60, 60-80, 80-100 y >100 μm).



Fi. 15. Sistema de muestreo de jeringa con contador de partículas LiQuilaz
(ampliación de detalle a la derecha)

2.2.2.2. Porcentaje de fangos

El porcentaje de fangos finos, gruesos y claros se determinó a partir del volumen de cada uno de ellos con respecto al volumen total de vino. Para evitar pérdidas de fangos o mezclas con los claros durante su separación, la determinación se realizó en los mismos depósitos de clarificación antes del trasiego. El volumen (mL) de cada una de las fracciones se determinó midiendo la altura (cm) ocupada por cada uno de ellos en el depósito y conociendo la superficie de la base del mismo (13,3 x 13,3 cm).

2.2.3. Seguimiento de la fermentación

El control y seguimiento de la fermentación se llevó a cabo por medidas de densidad y biomasa realizadas cada dos días.

2.2.3.1. Determinación de la densidad

La densidad se determinó por medida directa de la muestra con un densímetro DMA 48 (ANTOM-PAAR, Net IterLab SAL, Madrid, España). Las muestras fueron previamente

centrifugadas con una centrífuga Microfriger-BL (SELECTA, Barcelona, España), desgasificadas en un ultrasonido de 1L de capacidad (SELECTA, Barcelona, España) y filtrada por filtros de 0,45 μm (Pall Acrodisc PSF, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España).

2.2.3.2. Determinación de la biomasa

La determinación de la biomasa se llevó a cabo en un microscopio óptico Leica CM E (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany) con cámara Neubauer (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany) (Fig. 16).



Fig. 16. Cámara Neubauer y microscopio Leica CM E utilizados en las determinaciones.

El número de células/mL se determinó según la siguiente ecuación teniendo en cuenta la dilución de la muestra.

$$N^{\circ} \text{ cél/mL} = n / (N_c \cdot V_c)$$

Donde n es el número de células contadas en los N_c cuadros pequeños, que tienen un volumen de V_c ($2,5 \cdot 10^{-7}$ mL según las características de la cámara).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para distinguir entre células viables y no viables se empleó la técnica de tinción con azul de metileno (Martínez, 1995; Castrejón, 2000). Al adicionar azul de metileno a la suspensión, las células no viables adquieren una tonalidad azulada, mientras que las viables mantienen su brillo original debido a que, éstas últimas, son capaces de degradar dicho componente.

El procedimiento seguido fue añadir un volumen conocido azul de metileno a otro volumen igual de muestra (relación 1:1) en un tubo de ensayo (en el caso de muestras muy concentradas, se diluyó previamente la misma con agua isotónica) y posteriormente realizar el recuento de células totales y viables (decoloradas) o de las no viables (azuladas).

La solución de azul de metileno se preparó con tampón fosfato sódico-potásico pH 4,5 (KH_2PO_4 6g/L, Na_2HPO_4 0,071 g/L) a una concentración de 0,2 g/L.

IV.2.3. CARACTERIZACIÓN DE VINOS

2.3.1. Análisis general de las muestras de vino

Al igual que en los mostos, todos los análisis se realizaron por triplicado en el vino una vez clarificado, filtrado y embotellado.

2.3.1.1. Determinación del grado alcohólico

El grado alcohólico se determinó por destilación de la muestra y posterior medida de densidad del destilado según los métodos oficiales de análisis de vinos (OIV, 1990). Para la medida de densidad se utilizó un densímetro DMA 48 (ANTOM-PAAR, Net IterLab SAL, Madrid, España).

El grado alcohólico se expresa en porcentaje en volumen, escrito como v/v.

2.3.1.2. Determinación de azúcares residuales

La determinación de azúcares residuales se realizó utilizando un equipo ViniTest™ (VinoBios, Dinamarca) suministrado por NUTRITEC (Barcelona) (Fig. 17).

El método de determinación ViniTest se basa en la conversión rápida, en un vial cerrado, de todos los azúcares fermentables residuales en una muestra de vino.

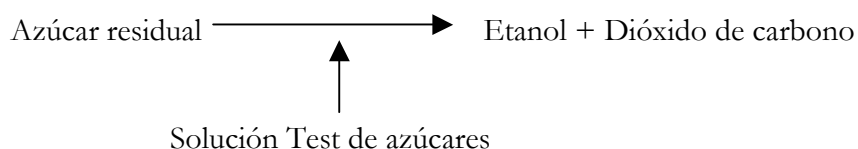


Fig. 17. Equipo ViniTest para la determinación de azúcares fermentables residuales

La conversión se inicia por la adición de la solución Test de azúcares, una vez rehidratada, que contiene levadura seca activa *S. cerevisiae*. El dióxido de carbono producido

durante dicha conversión está directamente correlacionado con la concentración de azúcar residual fermentable presente en la muestra. Luego, dicha concentración se calcula como:

$$\text{Azúcar (g/L)} = (\text{presión de la muestra} - \text{presión del blanco} - 0,15) \cdot 3,7$$

2.3.1.3. Determinación del pH

Siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.2.1.2.

2.3.1.4. Determinación de la acidez total

Siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.2.1.3.

2.3.1.5. Determinación de la acidez volátil

La acidez volátil se determinó utilizando un equipo de destilación García-Tena, que consta de un matraz de fondo redondo de 60 mL, un refrigerante y dos probetas de distintos volúmenes para la recepción del destilado (5,1 y 3,2 mL respectivamente). Se siguió la metodología descrita por Pérez y Morales (1998) en la cual se desechan los primeros 5,1 mL del destilado y los 3,2 mL restantes, obtenidos al cambiar de probeta, se valoran con NaOH 0,01 N utilizando fenolftaleína como indicador. La acidez volátil se calcula como:

$$\text{Acidez volátil (g/L ácido acético)} = 3 \cdot V \cdot 0,0545$$

2.3.1.6. Determinación de anhídrido sulfuroso

La determinación de sulfuroso libre y total se realizó siguiendo el procedimiento indicado por Pérez y Morales (1998). A 50 mL de muestra se le adicionaron 3 mL de SO_4H_2 al 1/10 y 5 mL de almidón. La disolución fue homogeneizada y valorada con I_2 0,05 N hasta

color violeta persistente (10 segundos). Tras la valoración, sobre la misma muestra, se adicionaron posteriormente 8 mL de NaOH 4 N, se agitó una sola vez, se tapó y se dejó en reposo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionaron 10 mL de SO_4H_2 1/10 agitando enérgicamente y se valoró nuevamente con I_2 0,05 N hasta coloración violeta persistente.

Siendo N y N' los volúmenes de yodo gastados en cada valoración (primera y segunda respectivamente) la concentración de sulfuroso libre, combinado y total se calculan como:

$$\text{Sulfuroso libre (mg/L)} = 32 N$$

$$\text{Sulfuroso combinado (mg/L)} = 32 N'$$

$$\text{Sulfuroso combinado (mg/L)} = 32 (N + N')$$

2.3.1.7. Determinación de glicerina

El contenido en glicerina se determinó por un método enzimático utilizando el método UV visible para la determinación de glicerina de Boehringer Mannheim (R-Biopharm, Alemania). Este método se basa en la medida espectrofotométrica a 340 nm de la cantidad de NADH oxidado, tras una serie de reacciones, la cual está directamente relacionada con la cantidad de glicerina de la muestra. Dichas medidas se realizaron con un espectrofotómetro UV-Visible HITACHI modelo U-2001 (PACISA Y GIRALT, SL, Grupo Taper, Madrid, España).

2.3.1.8. Determinación de absorbancias a 280 y 470 nm

Siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.2.1.5.

2.3.1.9. Determinación de la estabilidad oxidativa

El índice de estabilidad oxidativa es una medida indicativa de la tendencia al pardeamiento. Este análisis se realizó a las muestras de vino de maceración pelicular y supraextracción y se determinó por incremento de absorbancia a 470 nm de las muestras previamente saturadas con oxígeno (7-8 ppm) e incubadas, herméticamente cerradas, a 45°C durante 10 días (Palacios, 1998).

El contenido en oxígeno, tras agitación de las muestras, se determinó previamente a la determinación de la tendencia al pardeamiento. El equipo utilizado fue un oxímetro CRISON modelo OXI-330 (Net InterLab Madrid, España).

2.3.1.10. Determinación de cationes

Siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.2.1.7.

Las muestras de vinos procedentes de los ensayos de empleo de distintas cepas de levadura y adición de enzimas fueron analizadas por la División de Espectroscopia (ICP, AAS, ICP-MS) del Servicio Central de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz. Para ello se utilizó un equipo ICP-AES Iris Intrepid HR (Thermo Elemental)

2.3.1.11. Evaluación del color

Para la evaluación del color se utilizaron los parámetros CIELAB (L^* , a^* , b^*), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Internacional de L'Eclairage (CIE, 1986), que consideran que los parámetros CIELAB definen mejor el color de los vinos y permiten una mejor diferenciación (Almela y col., 1996; Heredia y col., 1997; Pérez-Magariño y González-San José, 2006). Aunque dichos parámetros se utilizan principalmente para determinar el color

de los vinos tintos, cada vez se está generalizando más su uso y aplicación a vinos blancos y rosados.

El espacio CIELAB (Fig. 18a) trata de representar la tonalidad de los colores mediante unas coordenadas L^* , a^* y b^* que representan tres ejes de graduaciones entre colores opuestos. Así, L^* va desde el blanco al negro, a^* desde el verde al rojo y b^* desde el amarillo al azul. La coordenada L^* recibe el nombre de claridad o luminosidad y puede tomar valores entre 0 y 100, para estímulos independientes toma siempre el valor 100 y no sirve para su especificación. Las coordenadas a^* y b^* forman un plano perpendicular a la claridad. La primera define la desviación de punto acromático correspondiente a la claridad hacia el rojo si $a^* > 0$ ó hacia el verde si $a^* < 0$. Análogamente, la coordenada b^* define la desviación hacia el amarillo si $b^* > 0$ ó hacia el azul si $b^* < 0$.

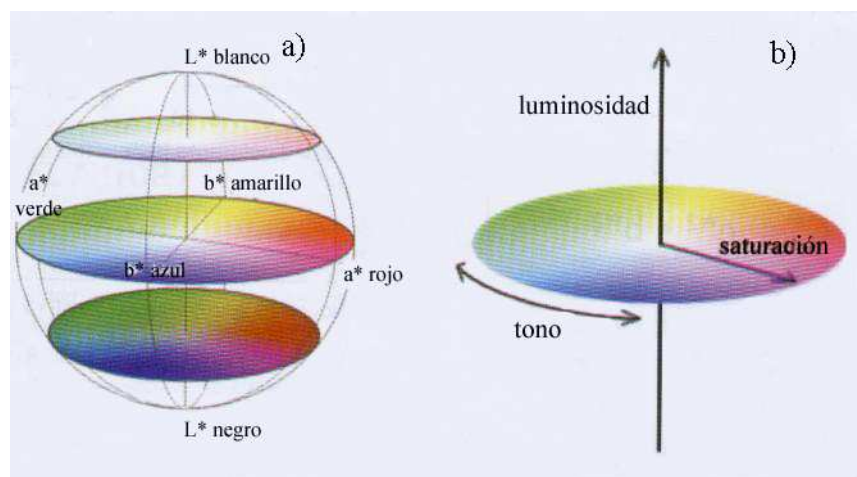


Fig.18. Coordenadas cromáticas del espacio CIELAB

El cálculo de L^* , a^* y b^* se determina a partir de los valores triestímulo X , Y , Z (rojo virtual, verde virtual y azul virtual respectivamente) según las siguientes ecuaciones (Salinas, 2004):

$$X = 19,717T_{450} + 1,884T_{520} + 42,539T_{570} + 32,474T_{630} - 1,841$$

$$Y = 7,950T_{450} + 34,764T_{520} + 42,736T_{570} + 15,759T_{630} - 1,180$$

$$Z = 103,518T_{450} + 4,190T_{520} + 0,251T_{570} + 1,831T_{630} + 0,818$$

Por otra parte, las coordenadas a^* y b^* pueden transformarse en las coordenadas esféricas H^* (Tono) y C^* (Croma o Saturación) (Fig.18b) según las ecuaciones:

$$H^* = \arctg(b^*/a^*)$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Así, la Claridad, el Tono y la Saturación definen el color del vino dentro del espacio CIELAB permitiendo una definición del mismo mucho más precisa que los parámetros estándar (Salinas, 2004; Castellucci, 2006).

En nuestro estudio los parámetros CIELAB se calcularon determinando la totalidad del espectro (380-780 nm) y su parametrización a intervalos de 5 nm en un espectrofotómetro de barrido UV-Visible 2001 HITACHI (PACISA Y GIRALT, SL, Grupo TAPER, Madrid, España) usando cubetas de 10 mm. Para los cálculos se tuvieron en cuenta como condiciones estándar un observador de CIE 1964 (10°) (ángulo de percepción de un observador humano) y un iluminante D65 (luz del día). Las muestras fueron previamente filtradas a través de filtros de PTFE de 0,45 µm ValuPrep™ (PALL).

2.3.1.12. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios

Los compuestos volátiles mayoritarios (acetaldehído, diacetilo, acetato de etilo, metanol, n-propanol, isobutanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol) se determinaron por cromatografía gaseosa, a través de inyección directa de las muestras destiladas usando 4-metil-2-pentanol como patrón interno. Se usó un cromatógrafo de gases modelo HP 5890 Serie II (Hewlett Packard, Agilent Technologies España SL) con inyector automático (modelo

HP7673A) y detector FID, equipado con una columna capilar Carbowax 20 (50 m x 0,25 mm ID; 0,25 μ m). Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector y detector a 250° C; H₂ como gas portador; la temperatura del horno se programó a 35° C durante 10 min, para después subir con una rampa de 4° C/min hasta 200° C donde se mantuvo durante 5 min. El volumen de muestra inyectada fue de 20 μ L.

IV.3. ANÁLISIS DE AROMAS

IV.3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para evitar interferencias por parte del alcohol, previamente a la extracción en fase sólida, los vinos se diluyeron hasta aproximadamente 2-3% vol. con agua destilada. Posteriormente se le adicionaron 0,4 mL de patrón interno (1-heptanol a concentración de 64 mg/L) y se concentraron por extracción en fase sólida.

IV.3.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

3.2.1. Equipo

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida de las muestras, se empleó un colector múltiple *Visiprep-DL Solid Phase Extraction Vacuum Manifolds* (SUPELCO INC, Bellefonte, PA), capaz de preparar simultáneamente 12 muestras. Un esquema de las partes de este equipo se muestra en la Fig.19.

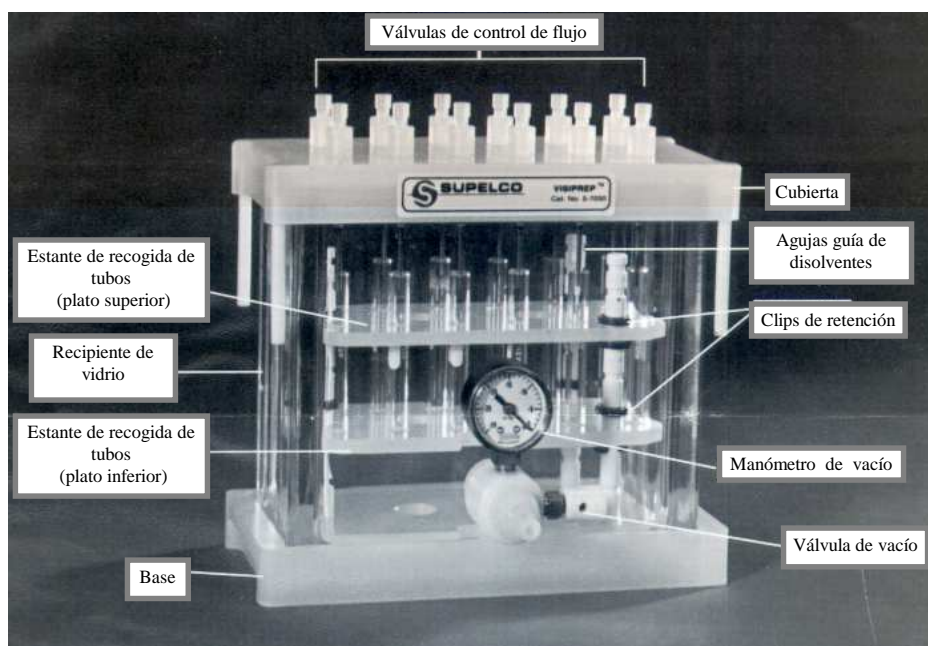


Fig. 19. Colector múltiple para extracción en fase sólida de 12 muestras, usado en este estudio

3.2.2. Metodología

Para la extracción en fase sólida de los analitos investigados se utilizaron cartuchos de tipo DSC-18 de 1 g (6 mL) (SUPELCO, Bellefonte PA, USA) y se siguió la metodología propuesta por Di Stefano (1991) y Valcárcel (2006) con algunas modificaciones.

Los cartuchos se acondicionaron con 3 mL de MetOH y con 5 mL de agua destilada. Posteriormente se añadieron 50 mL de muestra preparada según el apartado IV.3.1. y se lavó el cartucho con 12 mL de agua destilada para eliminar los compuestos no deseados. Los compuestos volátiles se eluyeron con 10 mL de diclorometano, a los cuales se les adicionó sulfato sódico anhidro para eliminar restos de agua. Tras la eliminación del agua las muestras eluidas se pasaron a tubos de ensayo en donde se concentraron hasta 0,2 mL bajo corriente de

nitrógeno. Dicho volumen se pasó a viales de 1 mL con insertos de 0,2 mL para su análisis por GC-MM.

IV.3.3. ANÁLISIS GASES-MASAS (GC-MM)

3.3.1. Equipo

El equipo utilizado fue un GC-MM modelo Voyager (Termoquest, Finnigan, Milán, Italia) perteneciente a la División de Espectrometría de masas del Servicio Central de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz (Fig.20).



Fig.20. Equipo GC-MS Voyager del SCCYT de la Universidad de Cádiz.

3.3.2. Metodología

3.3.2.1. Método cromatográfico

Para el análisis de compuestos volátiles por GC-MM se utilizó una columna Supelcowax 10 (60 m x 0,32 mm ID; 0,50 μm). Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector y detector de 250°C; el horno se programó a una temperatura de 40°C (5 min) para después subir hasta 200°C (5 min) con una rampa de 2°C/min. Las condiciones del masas fueron: modo de impacto electrónico (EI+) a 70 eV; temperatura de origen y de la interface fueron 220 y 320°C, respectivamente; índice de barrido de 1 scan/s; adquisición de masas de 45-400 a.m.u. Dos microlitros de volumen de muestra inyectada en modo splitless (40 s); y He como gas portador (1 mL/min).

3.3.2.2. Cuantificación de compuestos de interés

La identificación de los picos se basó en la comparación de los tiempos de retención y espectros de masa con patrones disponibles de Sigma-Aldrich (Tabla 14). En los casos en que los patrones no estaban disponibles, los picos se identificaron por comparación con los datos de espectros del programa Xcalibur (versión 1.1) y con los datos cromatográficos de la bibliografía. Se realizó un análisis semicuantitativo de estos compuestos asumiendo factores de respuesta igual a 1.

Tabla 14. Compuestos aromáticos utilizados como patrón para identificación y cuantificación de picos.

| Terpenos | Ácidos | Alcoholes | Ésteres |
|---------------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| α -Terpineol | Isobutírico | Isobutanol | Acetato de etilo |
| β -Linalol | 2-metilbutírico | 1-butanol | Acetato de isobutilo |
| Citronelol | Hexanoico | Alcohol isoamílico | Butirato de etilo |
| Geraniol | Heptanoico | 1-hexanol | Isovalerato de etilo |
| Nerol | Octanoico | 3-hexen-1-ol | Acetato de isoamilo |
| Óxido de linalol | Nonanoico | 1-octanol | n-amilacetato |
| | | 1-octen-3-ol | Acetato de cis-hexenilo |
| | Decanoico | Alcohol bencílico | Hexanoato de etilo |
| | | 2-feniletanol | Lactato de etilo |
| | | 1-heptanol | Octanoato de etilo |
| | | | 3-hidroxibutirato de etilo |
| | | | Decanoato de etilo |
| | | | Succinato de dietilo |
| | | | Acetato de 2-feniletilo |
| | | | Cinamato de etilo |
| | | | 2-Decenoato de etilo |

IV.3.4. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE AROMA

El aroma de un vino se describe en términos de varios descriptores de acuerdo con varios expertos. La agrupación de compuestos aromáticos con descriptores similares en series de aroma da un perfil organoléptico del vino, lo que permite relacionar la información cuantitativa derivada del análisis químico con percepciones sensoriales. Así, se obtiene un perfil aromático del vino más simple y basado en un criterio más objetivo (Peinado y col., 2004).

En la Tabla 15 se recogen gran parte de los compuestos aromáticos estudiados junto con sus umbrales de percepción y descriptores aromáticos según numerosos autores. A cada componente se le asignó una serie aromática dependiendo de su principal descriptor de olor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este propósito se escogieron las series floral (F), afrutada (A), herbácea (H), especiada (E), de oxidación (DO), láctica (L) y otros (O), como descriptores para vinos blancos jóvenes en términos de aromas.

Los compuestos con el mayor umbral de percepción ($>10000 \mu\text{g/L}$) son el 1-butanol, 1-pentanol, 3-etoxi-1-propanol, 2-feniletanol, 3-hidroxibutirato de etilo, heptanoato de etilo, acetaldehído, acetato de etilo y los alcoholes superiores, que pertenecen a distintas familias químicas y contribuyen a las series (herbácea, láctea, afrutada, floral y otros).

Por otra parte, los compuestos con menor umbral de percepción ($< 50 \mu\text{g/L}$) son el ácido isovalérico, linalol, geraniol, los fenoles volátiles y algunos ésteres como el butirato de etilo, isovalerato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y cinamato de etilo que contribuyen a las series láctea, floral, especiada y, mayoritariamente por la gran participación de ésteres, a la serie afrutada.

Un tercer grupo englobaría a los compuestos con un umbral de percepción comprendido entre los 100 y 1200 $\mu\text{g/L}$, constituido por los ácidos hexanoico, decanoico y octanoico; los compuestos terpénicos α -terpineol, citronelol y nerol; los alcoholes 1-hexanol, trans-3-hexen-1-ol, cis-3-hexen-1-ol y el alcohol bencílico; así como por los ésteres acetato de hexilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, acetato de feniletilo y dodecanoato de etilo; y por el metionol. Estos compuestos contribuyen a las series herbácea, floral, láctea y afrutada.

Tabla 15. Valores umbral y descriptores aromáticos de los compuestos estudiados.

| COMPUESTO | SINÓNIMO | DESCRIPTOR AROMÁTICO | U.O. |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------|
| ACIDOS (µg/L) | | | |
| Hexanoico | Ac. Caproico | Vegetal, herbáceo, eucalipto | 420 ⁽¹⁾ |
| Decanoico | Ác. Cáprico | Graso, desagradable, agrio | 1000 ⁽²⁾ |
| Octanoico | Ác. Caprílico | Queso, mantequilla rancio, agrio | 500 ⁽²⁾ |
| Isovalérico | Ác. 3-metilbutírico, ác. isopentanoico | Queso azul, ácido, agrio | 33 ⁽¹⁾ |
| TERPENOS (µg/L) | | | |
| Linalool | 2,6-dimetil-2,7-octadien-2,6-diol | Floral, violeta, bergamote, lavanda | 15 ⁽²⁾⁽³⁾ |
| α-terpineol | p-ment-1-en-8-ol | Floral, como a lila | 250 ⁽⁶⁾ |
| Citronelol | 3,7-dimetil-6-en-1-ol | Clavo, verde, rosa ajada, fresco | 100 ⁽³⁾ |
| Nerol | neronol, neraniol, 3,7-dimetil-2(cis),6-ocatien-1-ol | Floral, afrutado | 500 ⁽⁴⁾ |
| Geraniol | 3,7-dimetil-2(trans),6-dien-1-ol | Floral, como a rosa, geranio | 30 ⁽⁵⁾ |
| Hotrienol | 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | Floral, fresco | 110 ⁽⁹⁾ |
| (Z) Óxido de linalol | | Floral, fresco | 6 ⁽⁹⁾ |
| (E) Óxido de linalol | | Floral, fresco | 6 ⁽⁹⁾ |
| ALCOHOLES (µg/L) | | | |
| 1-butanol | | Hierba cortada, | 150000 ⁽²⁾ |
| 1-pentanol | | Herbáceo | 676000 ⁽³⁾ |
| 1-hexanol | | Verde, hierba, hierba cortada | 1100 ⁽²⁾ |
| trans-3-hexen-1-ol | alcohol de hojas | Fresco | 400 ⁽⁴⁾ |
| 3-etoxi-1-propanol | | Afrutado | 50000 ⁽³⁾ |
| cis-3-hexen-1-ol | alcohol de hojas | Hierba recién cortada | 400 ⁽¹⁾ |
| Alcohol bencílico | Fenilcarbinol | Rosa, floral, dulce | 900 ⁽⁴⁾ |
| Alcohol feniletílico | Feniletanol | Rosas, miel, lila, | 10000 ⁽³⁾⁽⁵⁾ |
| FENOLES VOLÁTILES (µg/L) | | | |
| 2-metoxi-4-vinilguayacol | 2-metoxi-4-vinilfenol | Clavo, especiado | 40 ⁽⁸⁾ |
| p-etilguayacol | | Pimienta, clavo, especia | 46 ⁽³⁾ |
| ÉSTERES (µg/L) | | | |
| Butirato de etilo | n-butanoato de etilo, éster butírico | Fruta ácida, manzana | 20 ⁽¹⁾⁽³⁾ |
| Isovalerato de etilo | isopentanoato de etilo | Fruta dulce, naranja, baya, mora | 3 ⁽¹⁾ |
| Acetato de isoamilo | Acetato de isopentilo | Plátano | 30 ⁽¹⁾ |
| Acetato de hexilo | | Pera | 670 ⁽²⁾ |
| 3-hidroxibutirato de etilo | | Rancio, fenólico | 67000 ⁽³⁾ |
| Hexanoato de etilo | Caproato de etilo | Manzana verde, afrutado | 5 ⁽³⁾ |
| Heptanoato de etilo | | Levadura, afrutado | 100000 ⁽³⁾ |
| Octanoato de etilo | Caprilato de etilo | Afrutado, pera, piña, dulce | 5 ⁽¹⁾ |
| Decanoato de etilo | Caprato de etilo, decilato de etilo | Fruta verde, como a fruto seco | 200 ⁽¹⁾ |
| Succinato de dietilo | Succinato de etilo | Afrutado | 1200 ⁽²⁾ |
| Acetato de feniletílico | Acetato de fenetilo | Agradable, floral, miel, dulce | 250 ⁽⁵⁾ |
| Dodecanoato de etilo | Laurato de etilo | Hoja | 100 ⁽³⁾ |
| Cinamato de etilo | | Fresa, crema | 1 ⁽¹⁾ |
| ALCOHOLES SUPERIORES (mg/L) | | | |
| 1-propanol | propil alcohol | Afrutado | 306 ⁽²⁾ |
| 2-metil-1-propanol | isobutanol, isobutil alcohol | A vino | 30 ⁽⁷⁾ |
| 2-metil-1-butanol | sec-Butyl carbinol, alcohol amílico activo primario | Alcohol con notas afrutadas | 30 ⁽⁷⁾ |
| 3-metil-1-butanol | alcohol isoamílico primario | Alcohol de fusel, a wiskey | 30 ⁽⁷⁾ |
| TIOLES (µg/L) | | | |
| 3-metil-1-propanol | metilmercaptopropil alcohol | Terroso, ajo, cebolla | 1000 ⁽⁸⁾ |
| COMPUESTOS CARBONIL (mg/L) | | | |
| Acetaldehído | metilacetaldéhid | Almendra amarga | 10 ⁽³⁾ |
| Acetato etílico | éster etílico del ácido acético | A brandy, a pegamento | 12 ⁽⁶⁾ |

(1) Escudero y col., 2000; (2) Peinado y col., 2004; (3) Mayén y col., 2005; (4) Valcárcel, 2006; (5) Selli y col., 2005; (6) Gómez-Míguez y col., 2007; (7) Ferreira y col., 2002; (8) Campo y col., 2006; (9) Castro-Vázquez y col., 2007.

IV.4. ANÁLISIS SENSORIAL

La evaluación sensorial de los vinos fue realizada por un panel de seis catadores con experiencia en la sala de catas del Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas (CAIV, Puerto Real, Cádiz), que cuenta con mesas individuales separadas por paneles y luz regulable (Fig.21).

Los vinos se presentaron, en cada sesión, en copas de cata normalizadas 3591 (ISO 3591, 1997) y cubiertas con vidrio de reloj para minimizar la evaporación de compuestos volátiles. Las catas se realizaron entre las 11:30 h y las 14:00 horas y los vinos estuvieron a una temperatura de 10-12°C.



Fig. 21. Sala de catas del CAIV
(Puerto Real, Cádiz)

A cada catador se le proporcionó una ficha de cata específica (Fig.22) con la que se puntuaron los caracteres visuales, olfativos y gustativos, considerados de mayor relevancia para este tipo de vinos, así como la valoración global. Cada uno de los caracteres se puntuó de 0 a 5 según la sensación percibida (desde nula a muy fuerte) anotando también algunos aspectos de interés sobre las muestras (determinados aromas, defectos, etc.) en el apartado de “Notas de cata”, sobre todo las características sensoriales más destacadas de cada vino y, particularmente, aquellas que distinguían un vino de otro.

Las distintas sesiones se organizaron en función de la variedad y del tipo de elaboración, de manera que para variedad se realizó una cata según la alternativa tecnológica aplicada (maceración pelicular, supraextracción, empleo de cepas de levaduras y adición de enzimas). Previamente a dichas sesiones se informaba a los catadores del proceso de elaboración de los vinos así como de algunos parámetros fisicoquímicos generales (acidez total, pH, acidez volátil y anhídrido sulfuroso).

IV.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el estudio estadístico de los resultados se aplicó el paquete estadístico STATISTICA Release 7 (Statsoft, Inc-USA), del cual se aplicaron los siguientes análisis multivariantes: análisis de regresión lineal múltiple, mediante matriz de correlación; análisis de componentes principales, con giro varimax normalizado; análisis lineal discriminante; análisis de clúster; y análisis de varianza aplicando el método t-student con probabilidades $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ (no significativa, poco significativa, significativa y muy significativa, respectivamente).

FICHA DE CATA

Fecha:

Catador:

Variedad:

Puntuación: 0-5

(nulo o muy débil, débil, medio, fuerte, muy fuerte)

| | | VINOS | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|-------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Caracteres | | | | | | | | | | | |
| EXAMEN VISUAL | Limpidez | | | | | | | | | | |
| | Brillantez | | | | | | | | | | |
| | Intensidad | | | | | | | | | | |
| | Tonalidad | | | | | | | | | | |
| | Calidad (aspecto y color) | | | | | | | | | | |
| EXAMEN OLFATIVO | Intensidad | | | | | | | | | | |
| | Calidad | | | | | | | | | | |
| | Nota vegetal | | | | | | | | | | |
| | Nota floral | | | | | | | | | | |
| | Nota afrutada | | | | | | | | | | |
| | Nota especiada | | | | | | | | | | |
| | Nota balsámica | | | | | | | | | | |
| | Otras notas | | | | | | | | | | |
| EXAMEN GUSTATIVO | Suavidad | | | | | | | | | | |
| | Acidez | | | | | | | | | | |
| | Calidez | | | | | | | | | | |
| | Amargor | | | | | | | | | | |
| | Persistencia | | | | | | | | | | |
| | Calidad | | | | | | | | | | |
| VALORACIÓN GLOBAL | Calidad de conjunto | | | | | | | | | | |

Notas de cata:

Fig.22. Ficha de cata utilizada en el análisis sensorial de todos los vinos ensayados

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y la discusión de este trabajo se ha ordenado en función del tipo de tecnología aplicada, apareciendo en primer lugar los tratamientos prefermentativos de maceración pelicular y supraextracción y, posteriormente, la aplicación de cepas de levaduras específica de la zona y comerciales, y extractos enzimáticos.

En el caso de los tratamientos prefermentativos se realiza un estudio sobre la influencia de dicho tratamiento en las características del mosto y del vino así como sobre los procesos de desfogado y fermentación. Posteriormente se estudia la influencia de dichos tratamientos sobre la composición aromática y las características sensoriales de los vinos, incluyendo un estudio estadístico de los resultados.

Los estudios de aplicación de cepas de levaduras y extractos enzimáticos se centran en su influencia sobre la composición química y aromática y el perfil sensorial, y en el primer caso se estudia también la capacidad fermentativa de cada cepa.

Para cada uno de los tratamientos y estudios realizados se muestran los resultados obtenidos para cada variedad (*Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*) realizando una comparativa en cuanto al comportamiento de cada una de ellas frente al tratamiento aplicado.

Finalmente se realiza un estudio estadístico comparativo entre las técnicas aplicadas destacando las ventajas e inconvenientes que ofrecen cada una de ellas a la elaboración de vinos de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*.

V.1. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MACERACIÓN PELICULAR SOBRE LA ELABORACIÓN DE VINOS DE *Palomino fino* Y *Moscatel de Alejandría*

V.1.1. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MOSTO

Dada la gran influencia que tiene las características de la materia prima en el producto final, es de gran importancia determinar los efectos de la maceración pelicular sobre las características generales del mosto.

Como se puede observar en las Tablas 16 y 17, de forma general en ambas variedades se produce una disminución significativa de la acidez total del mosto con el tiempo de maceración, con el consecuente aumento del pH. Según algunos autores (Delteil y col., 2000; Riberéau-Gayón y col., 2003) esto se debe a la precipitación del ácido tartárico por la extracción y solubilización del K de los hollejos, así como de la salificación de los ácidos, que también conduce a un aumento del pH. Este fenómeno se ve acompañado de un incremento del K a lo largo de la maceración, más evidente en el caso de la variedad *Moscatel de Alejandría*. Para ambas variedades, sin embargo, el efecto que produce la maceración pelicular sobre dichos parámetros (acidez total, pH y K) no es tan acusado como ocurre en otros estudios, lo que podría deberse a que la temperatura de maceración empleada en este trabajo (15°C) es relativamente baja comparada con otros estudios (18-20°C).

En cuanto al índice de polifenoles totales (IPT) y la absorbancia (ABS 470 nm), indicativos respectivamente del contenido en polifenoles y de su nivel de oxidación, se observa que, en el caso de los mostos de *Palomino fino*, el IPT aumenta ligeramente con la maceración (con algunos altibajos) y de manera más importante la ABS 470 nm. En los mostos de *Moscatel de Alejandría*, se produce un aumento del IPT considerable y, sin embargo, la ABS 470 nm permanece prácticamente invariable.

Tabla 16. Análisis general de los mostos procedentes de uva *Palomino fino* (Media \pm DS*)

| | t mac. (horas) | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 |
| Rendimiento (L/Kg) | 0,53 \pm 0,01 | 0,63 \pm 0,03 | 0,62 \pm 0,02 | 0,62 \pm 0,02 |
| Be | 12,0 \pm 0,0 | 12,0 \pm 0,1 | 12,1 \pm 0,1 | 12,0 \pm 0,00 |
| pH | 3,86 \pm 0,01 | 3,92 \pm 0,01 | 3,95 \pm 0,01 | 3,99 \pm 0,01 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 3,07 \pm 0,07 | 2,95 \pm 0,06 | 2,68 \pm 0,02 | 2,55 \pm 0,02 |
| IPT | 12,08 \pm 0,03 | 13,71 \pm 0,10 | 12,25 \pm 0,22 | 13,37 \pm 0,06 |
| ABS 470 | 0,110 \pm 0,001 | 0,140 \pm 0,001 | 0,190 \pm 0,003 | 0,240 \pm 0,011 |
| Ácido málico (g/L) | 0,835 \pm 0,090 | 0,710 \pm 0,042 | 0,820 \pm 0,018 | 0,783 \pm 0,003 |
| Ácido glucónico (g/L) | 0,175 \pm 0,022 | 0,380 \pm 0,019 | 0,550 \pm 0,006 | 0,424 \pm 0,011 |
| N. asimilable (mg/L) | 234,8 \pm 4,5 | 151,4 \pm 3,5 | 193,7 \pm 7,8 | 114,0 \pm 5,3 |
| Na (mg/L) | 34,0 \pm 0,2 | 32 \pm 0,2 | 27 \pm 0,6 | 29 \pm 0,2 |
| K (mg/L) | 1092 \pm 1 | 1010 \pm 4 | 1060 \pm 8 | 1066 \pm 5 |
| Fe (mg/L) | 0,100 \pm 0,001 | 0,100 \pm 0,003 | 0,100 \pm 0,004 | 0,100 \pm 0,005 |
| Mg (mg/L) | 57,5 \pm 0,6 | 57,5 \pm 0,1 | 57,5 \pm 0,5 | 57,5 \pm 0,3 |
| Ca (mg/L) | 135,0 \pm 0,5 | 117,5 \pm 0,4 | 115,0 \pm 0,3 | 116,0 \pm 1,0 |
| Cu (mg/L) | 1,00 \pm 0,01 | 0,90 \pm 0,07 | 0,70 \pm 0,01 | 0,70 \pm 0,02 |
| Zn (mg/L) | 0,40 \pm 0,02 | 0,40 \pm 0,01 | 0,40 \pm 0,01 | 0,40 \pm 0,00 |

* DS: desviación estándar

Estos resultados nos muestran que, tal y como ocurre con otras variedades, durante la maceración se produce una extracción de compuestos polifenólicos en ambas variedades (Darias-Martín y col., 2000), sin embargo, en nuestro caso dicha extracción es moderada ya que la temperatura a la cual se realiza la maceración no favorece la solubilización de estos compuestos.

Por otra parte, hay que resaltar que, en el caso particular de los mostos de *Palomino fino* los valores de IPT son más altos que los de *Moscatel de Alejandría* y los valores de ABS 470 nm tienden a aumentar significativamente. Esto parece indicar que al mismo tiempo que se produce la extracción de compuestos polifenólicos tiene lugar la oxidación de los mismos, lo que confirma los resultados obtenidos por Fernández-Zurbano y col. (1999). El hecho de que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

con los mostos de *Moscatel* no tenga lugar el mismo fenómeno nos indica que la variedad *Palomino fino* presenta mayor carga enzimática polifenoloxidasa (PPO) y/o que los compuestos polifenólicos extraídos durante la maceración presentan mayor tendencia a la oxidación. En este sentido, González (2002) resalta la actuación de la PPO sobre los cinamatos (sobre todo ésteres tartáricos de los ácidos cinámicos) como el factor más importante de pardeamiento.

Tabla 17. Análisis general de los mostos procedentes de uva *Moscatel de Alejandría* (Media \pm DS).

| | t mac. (horas) | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 |
| Rendimiento (L/Kg) | 0,63 \pm 0,01 | 0,53 \pm 0,06 | 0,56 \pm 0,02 | 0,57 \pm 0,01 |
| Be | 13,0 \pm 0,1 | 13,0 \pm 0,1 | 13,1 \pm 0,1 | 13,1 \pm 0,0 |
| pH | 3,71 \pm 0,01 | 3,75 \pm 0,01 | 3,78 \pm 0,01 | 3,81 \pm 0,00 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 5,30 \pm 0,10 | 5,00 \pm 0,20 | 4,60 \pm 0,10 | 4,60 \pm 0,10 |
| IPT | 8,19 \pm 0,17 | 10,58 \pm 0,14 | 10,50 \pm 0,02 | 10,66 \pm 0,04 |
| ABS 470 | 0,175 \pm 0,001 | 0,182 \pm 0,004 | 0,127 \pm 0,002 | 0,174 \pm 0,004 |
| Ácido málico (g/L) | 1,130 \pm 0,013 | 1,370 \pm 0,009 | 1,308 \pm 0,012 | 1,369 \pm 0,006 |
| Ácido glucónico (g/L) | 0,545 \pm 0,122 | 1,251 \pm 0,212 | 0,864 \pm 0,126 | 0,604 \pm 0,152 |
| N. asimilable (mg/L) | 505,6 \pm 5,1 | 328,9 \pm 3,7 | 300,5 \pm 5,9 | 288,1 \pm 2,0 |
| Na (mg/L) | 31,0 \pm 0,3 | 38,0 \pm 0,8 | 38,1 \pm 0,6 | 32 \pm 0,5 |
| K (mg/L) | 1070 \pm 3 | 1137 \pm 12 | 1165 \pm 4 | 1197 \pm 3 |
| Fe (mg/L) | 0,100 \pm 0,010 | 0,100 \pm 0,003 | 0,100 \pm 0,004 | 0,100 \pm 0,020 |
| Mg (mg/L) | 62,5 \pm 0,4 | 62,5 \pm 0,6 | 62,8 \pm 0,4 | 62,5 \pm 0,6 |
| Ca (mg/L) | 130,0 \pm 1,0 | 130,0 \pm 0,5 | 130,0 \pm 1,4 | 129,7 \pm 1,5 |
| Cu (mg/L) | 1,41 \pm 0,02 | 1,10 \pm 0,01 | 0,91 \pm 0,01 | 0,90 \pm 0,00 |
| Zn (mg/L) | 0,91 \pm 0,01 | 0,70 \pm 0,01 | 0,70 \pm 0,02 | 0,70 \pm 0,01 |

Otro de los efectos que tiene la maceración pelicular, referenciado por numerosos autores, es enriquecer los mostos en compuestos nitrogenados, esenciales para el crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, los resultados en las dos variedades revelan que el contenido en nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) disminuye con el tiempo de maceración siendo esta disminución más acusada a las 4 horas de maceración. En los mostos de la variedad *Palomino fino*, la cual desde el inicio presenta unos niveles más bajos

de NFA que los de *Moscatel de Alejandría*, se llegan incluso a alcanzar niveles de NFA por debajo del límite establecido para una fermentación completa (< 150 mg/L) (Hidalgo, 2003) al cabo de las 12 horas de maceración.

Estos resultados no concuerdan con la mayoría de los estudios realizados por otros autores (Aldave, 1992; Aldave y col., 1992; Dubordieu y col., 1986, 1989), sin embargo, parece ser que determinadas variedades, como la *Macabeo*, presentan menores contenidos de aminoácidos con la maceración (Hernández-Orte y col., 1998). Por otra parte, hay que señalar que la concentración de nitrógeno fácilmente asimilable se determinó tras el desfangado, luego se pudo producir un arrastre y/o adsorción del nitrógeno asimilable, más o menos importante, dependiendo de las características de las burbas y del desarrollo del proceso.

En cuanto al contenido en ácido málico, cada variedad presenta un comportamiento diferente. En el caso de la *Palomino fino* se produce una ligera disminución que podría estar causada por la propia solubilización del K que daría lugar a la precipitación de ácido málico junto con el ácido tartárico (Gutiérrez y col., 1990). Sin embargo, en la *Moscatel de Alejandría*, al igual que ocurre con los mostos de *Albariño* (Orriols y Moreno, 1992), el ácido málico se incrementa durante la maceración, aunque no tiene mucho efecto sobre la acidez total.

El ácido glucónico es un parámetro indicativo del estado sanitario de la uva. No existen estudios previos sobre la influencia de la maceración pelicular sobre los niveles de ácido glucónico en los mostos, sin embargo, en este estudio se puede observar (Tablas 16 y 17) que, para ambas variedades, el contenido en ácido glucónico aumenta hasta alcanzar un máximo (8 h para la *Palomino fino* y 4 h para la *Moscatel de Alejandría*) para después disminuir hasta alcanzar niveles próximos a los iniciales. Este glucónico probablemente se origina en las células de los hollejos por oxidación enzimática de la glucosa.

Por último, en cuanto a la composición catiónica se refiere, la maceración pelicular no afecta de la misma manera a los cationes de ambas variedades. Mientras que en los mostos de

Palomino fino se observa una disminución de Na, Ca, y Cu, además del K, en los mostos de *Moscatel de Alejandría* el contenido en cationes permanece prácticamente invariable, a excepción del K que, como se comentó anteriormente, aumenta y el Cu y el Zn disminuyen.

Esta disminución de cationes, sobre todo el Cu podría deberse a la precipitación de los mismos junto con las proteínas durante el desfangado.

V.1.2. INFLUENCIA SOBRE EL DESFANGADO

Es bien conocido que la clarificación de los mostos o desfangado presenta numerosas ventajas desde el punto de vista de la calidad del vino elaborado. Así, bajo ciertos límites existe una relación entre el grado de desfangado y la calidad del vino. Sin embargo, un desfangado excesivo puede provocar ciertas dificultades en el desarrollo de la fermentación, por lo que es aconsejable una turbidez final de los mostos esté comprendida entre los 50 y 200 NTU (Hidalgo, 2003).

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta en el proceso de desfangado es la proporción y el grado de compactación de los fangos. La eficacia del desfangado vendrá dada no sólo por una turbidez óptima de los mostos, sino también por la baja proporción de fangos residuales, y su grado de compactación, que permita la obtención de una mayor proporción de claros.

Cuando se aplica la técnica de maceración pelicular, cabe esperar que aumente tanto la proporción de fangos como la turbidez del mosto, puesto que la maceración pelicular conlleva a una mayor extracción de sólidos del hollejo, sobre todo si durante el proceso se produce una agitación de la pasta, como es nuestro caso.

Como se puede observar en las Fig. 23 y 24 (*Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* respectivamente), tanto en los mostos de uva *Palomino fino* como los de *Moscatel de Alejandría*, la maceración pelicular provoca un aumento de la proporción de fangos siendo éste más importante para *Palomino fino*.

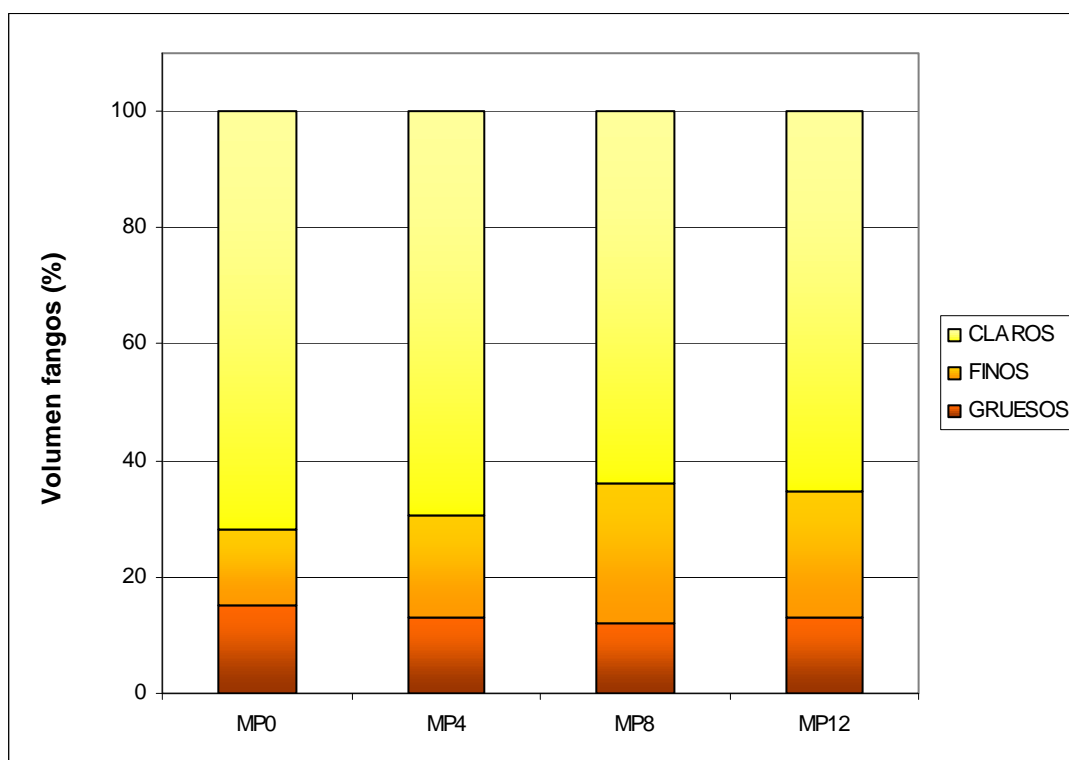


Fig. 23. Influencia de la maceración pelicular sobre el porcentaje de fangos de mostos *Palomino fino*

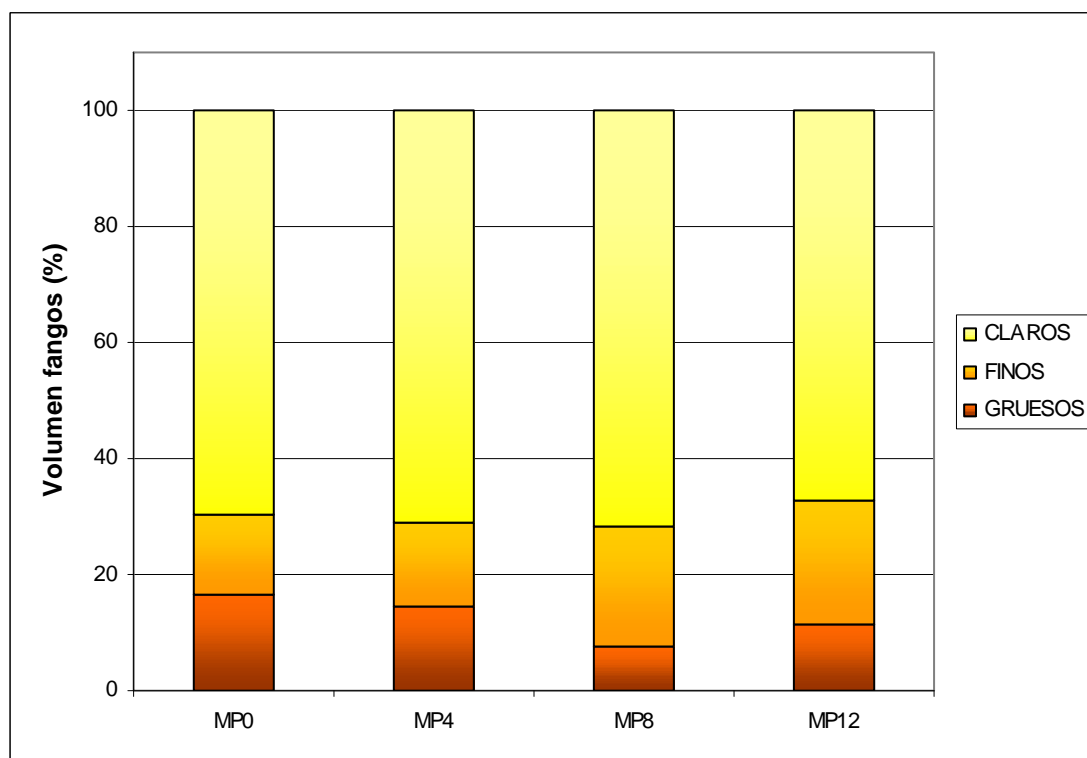


Fig. 24. Influencia de la maceración pelicular sobre el porcentaje de fangos de mostos *Moscatel de Alejandría*

Sin embargo, hay que destacar que dicho aumento se debe principalmente al aumento de la proporción de fangos finos, ya que la proporción de fangos gruesos, aunque con cierta variabilidad, disminuye con el tiempo de maceración para ambas variedades. Luego, la maceración pelicular aumenta el porcentaje de fangos disminuyendo el porcentaje de claros y, por tanto, disminuyendo el rendimiento de mosto obtenido. Para conseguir una mayor compactación de los fangos es aconsejable el uso de preparados enzimáticos con gran actividad pectinasa, sobre todo si las maceraciones son largas.

Atendiendo al número de partículas (tamaño variable entre 2 y $> 100 \mu\text{m}$), cabe esperar que en los mostos macerados durante más tiempo y sometidos a cierta agitación el número de partículas totales sea mayor. Sin embargo, como se puede observar en las Fig. 25 y

26, antes del desfangado el número de partículas totales se mantiene prácticamente invariable durante la maceración para los mostos de ambas variedades.

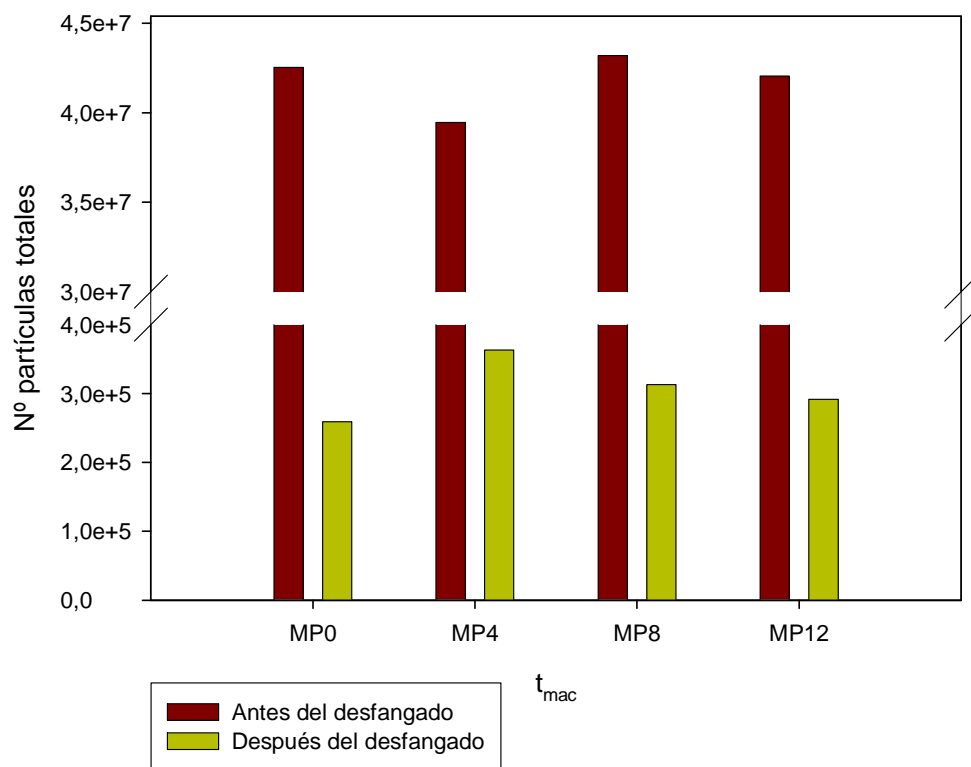


Fig. 25. Influencia de la maceración pelicular sobre el número de partículas totales de mostos de uva *Palomino fino* antes y después del desfangado

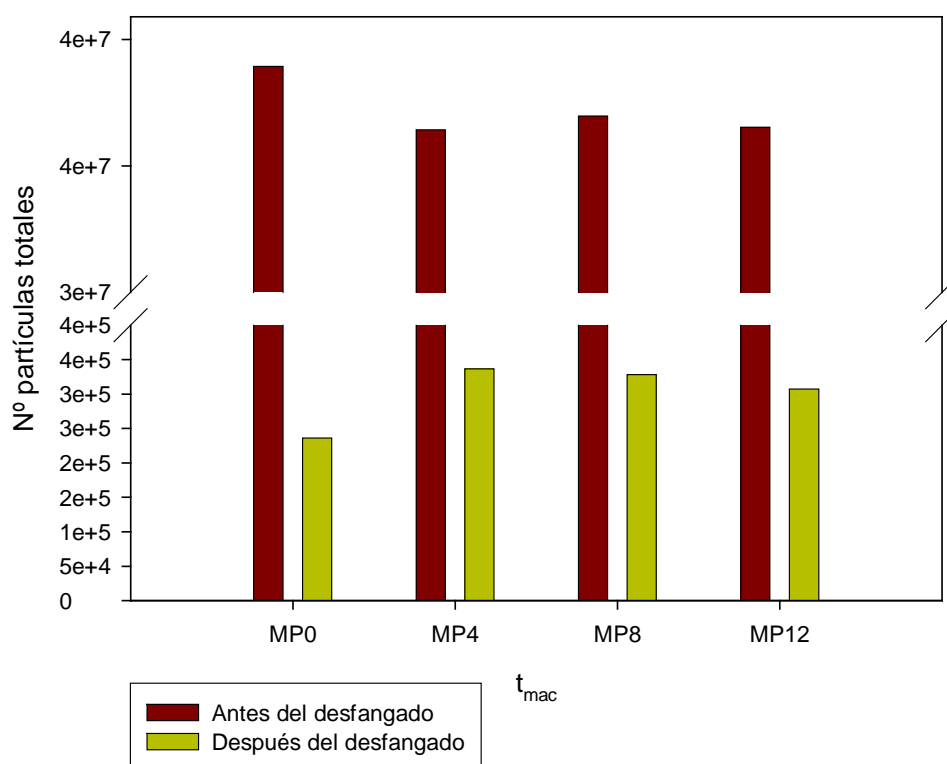


Fig.26. Influencia de la maceración pelicular sobre el número de partículas totales de mostos de uva *Moscatel de Alejandría* antes y después del desfangado

Tras el desfangado el número de partículas totales se reduce en un 99% en todos los casos, tanto a los distintos tiempos de maceración como para las dos variedades. Atendiendo a la distribución de partículas por tamaño (%) para cada variedad (Tablas 18 y 19) se observa que en los mostos de la variedad *Palomino fino* predominan las partículas de tamaño comprendido entre 2-5 μm seguidas por la de tamaño 5-10 μm , mientras que en los mostos de *Moscatel de Alejandría* la distribución de partículas por tamaño es más homogénea, encontrándose en igual proporción las de tamaño comprendido entre 2 y 10 μm , lo que explicaría que los mostos de *Moscatel* presenten mayores valores de turbidez inicialmente. La diferente distribución de partículas podría deberse a que la variedad *Palomino fino* tiene un hollejo más fino y frágil que la variedad *Moscatel de Alejandría*, luego las agitaciones producidas

cada 30 minutos durante la maceración han producido en el primer caso una mayor micronización de las partículas. Como consecuencia cada variedad evoluciona de forma diferente durante el desfangado.

Tabla 18. Distribución de partículas (%) antes (A) y después (D) del desfangado de los mostos de uva

Palomino fino

| t mac | Tamaño de partícula (μm) | | | | | | Turbidez (NTU) | Disminución turbidez (%) |
|-------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|------|----------------|--------------------------|
| | | 2-5 | 5-10 | 10-20 | 20-40 | > 40 | | |
| 0 | A | 74,02 | 22,61 | 3,13 | 0,21 | 0,03 | 976 ± 3 | - |
| | D | 56,16 | 35,85 | 6,40 | 1,11 | 0,47 | 56,5 ± 0,3 | 94,1 |
| 4 | A | 72,67 | 23,13 | 3,63 | 0,35 | 0,22 | 1117 ± 9 | - |
| | D | 62,99 | 34,86 | 1,69 | 0,36 | 0,11 | 115,7 ± 1,2 | 89,64 |
| 8 | A | 75,81 | 20,89 | 3,02 | 0,24 | 0,05 | 1134 ± 10 | - |
| | D | 37,26 | 58,63 | 3,55 | 0,42 | 0,10 | 168,5 ± 0,5 | 85,14 |
| 12 | A | 69,53 | 25,70 | 4,28 | 0,37 | 0,14 | 1141 ± 5 | - |
| | D | 23,38 | 64,22 | 12,08 | 0,28 | 0,04 | 234 ± 1 | 79,49 |

Tabla 19. Distribución de partículas (%) antes (A) y después (D) del desfangado de los mostos de uva

Moscatel de Alejandría

| t mac | Tamaño de partícula (μm) | | | | | | Turbidez (NTU) | Disminución turbidez (%) |
|-------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|------|----------------|--------------------------|
| | | 2-5 | 5-10 | 10-20 | 20-40 | > 40 | | |
| 0 | A | 42,17 | 40,71 | 15,81 | 1,18 | 0,13 | 2078 ± 7 | - |
| | D | 11,77 | 28,45 | 54,10 | 5,24 | 0,37 | 230,2 ± 10 | 88,92 |
| 4 | A | 37,62 | 40,52 | 19,98 | 1,71 | 0,16 | 2349 ± 3 | - |
| | D | 11,11 | 23,00 | 40,88 | 24,18 | 0,83 | 525,3 ± 1,8 | 77,64 |
| 8 | A | 42,75 | 40,11 | 15,75 | 1,14 | 0,25 | 2450 ± 35 | - |
| | D | 12,62 | 37,17 | 49,25 | 0,89 | 0,78 | 215,3 ± 4 | 91,21 |
| 12 | A | 39,86 | 41,55 | 17,37 | 1,10 | 0,11 | 2537 ± 1 | - |
| | D | 11,54 | 32,04 | 54,33 | 1,95 | 0,14 | 236 ± 1 | 90,70 |

En el caso de la variedad *Palomino fino* (Tabla 18), el desfangado conduce a una disminución de la proporción de partículas de tamaños entre 2 y 5 μm, sin embargo, aumenta

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la proporción de partículas de mayor tamaño, sobre todo las comprendidas entre 5 y 10 μm . Estos resultados nos indican que la disminución de turbidez se debe a la reducción de la proporción de partículas de 2-5 μm que, durante el desfangado, se aglomeran formando partículas de mayor tamaño ($> 5 \mu\text{m}$) las cuales en su mayor parte precipitan disminuyendo la turbidez de los mostos. Sin embargo, muchas de estas aglomeraciones no alcanzan tamaños adecuados para formar precipitados con lo cual quedan en el mosto provocando su enturbiamiento. Como se observa en la Tabla 18, el porcentaje de partículas entre 5 y 10 μm aumenta con el tiempo de maceración luego son directamente responsables de la turbidez de los mostos tras el desfangado y de que dicha turbidez aumente con el tiempo de maceración.

En la variedad *Moscatel de Alejandría*, el desfangado produce una reducción de la proporción de partículas comprendidas entre 2 y 10 μm , sin embargo, aumentan las comprendidas entre 10 y 20 μm . Además, como se observa en la Tabla 19, la disminución de la turbidez cae bruscamente a las 4 horas para volver a aumentar en las horas siguientes, lo que está relacionado con una menor reducción de partículas de 5-10 μm (más proporción tras el desfangado) y una mayor proporción de partículas de 10-20 μm .

De estos resultados se deduce que, por el contrario de lo que cabía esperar, el número de partículas totales no parece estar relacionado con la turbidez de los mostos antes y después del desfangado, aunque sí con la disminución de turbidez que se produce durante el mismo (Tablas 18 y 19). Asimismo, se deduce que las partículas que aportan mayor turbidez a los mostos son las de tamaño comprendido entre 2 y 5 μm constituidas en su mayor parte por partículas en suspensión. Mientras que las comprendidas entre 5 y 10 μm afectan directamente a la limpidez.

En definitiva, la eficacia del desfangado depende del equilibrio entre el fenómeno de micronización y el nivel de actividad pectolítica presente en el mosto de cada variedad. En este caso, como se puede observar en las Tablas 18 y 19, para los mostos de *Moscatel*, la actividad

pectolítica compensa el fenómeno de micronización. De ahí que la disminución de la turbidez se mantenga o incluso aumente con el tiempo de maceración.

V.1.3. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Los diferentes mostos desfangados se inocularon con una cepa de levadura seca activa comercial *Saccharomyces cerevisiae* (FERMIVIN: cepa n° 7013 seleccionada de Corbières por el INRA de Narbona). Posteriormente se realizó un control diario de densidad y biomasa para determinar la influencia de la maceración pelicular sobre la cinética fermentativa. Independientemente de la variedad, la maceración pelicular y el tiempo de contacto del mosto con el hollejo no influye en el desarrollo de la fermentación, no observándose diferencias significativas en cuanto al tiempo medio de fermentación y a la velocidad máxima de fermentación en cada caso (Tabla 20).

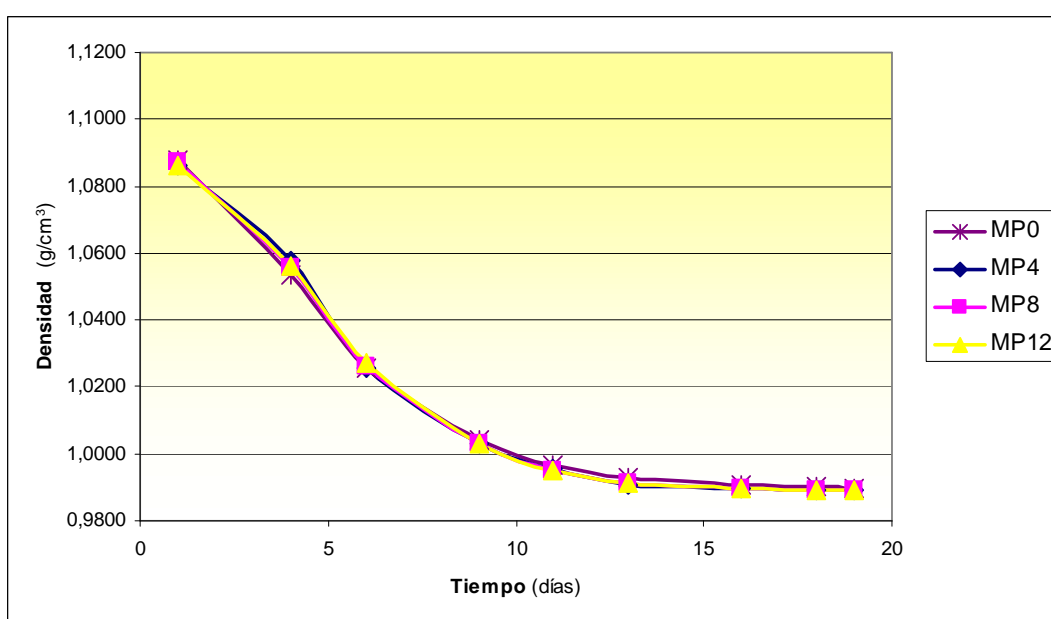


Fig. 27. Influencia de la maceración pelicular sobre la cinética fermentativa de mostos de uva

Palomino fino

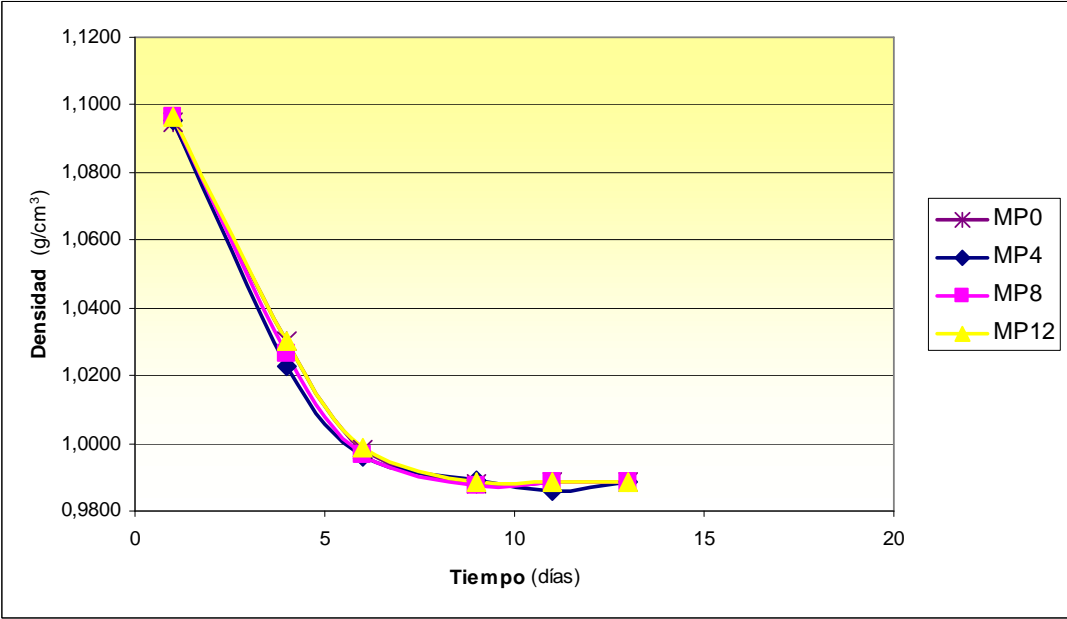


Fig. 28. Influencia de la maceración pelicular sobre la cinética fermentativa de mostos de uva *Moscatel de Alejandria*

Sin embargo, si se aprecian diferencias significativas en la cinética de ambas variedades. La velocidad de fermentación de los mostos de *Moscatel* es mucho más alta, duplicando la velocidad media de los de *Palomino fino*. En las Fig. 27 y 28 se pueden observar gráficamente estas diferencias, las cuales pueden deberse a los niveles más altos de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), encontrados en los mostos de *Moscatel* (Tablas 16 y 17).

Tabla 20. Influencia de la maceración pelicular sobre la velocidad de fermentación de los mostos de ambas variedades

| | | t_{medio} (días) | $V_{\text{máx.}}$ (días ⁻¹) |
|----------|------|---------------------------|---|
| Palomino | MP0 | 5,0 | 0,0142 |
| | MP4 | 5,0 | 0,0161 |
| | MP8 | 5,0 | 0,0146 |
| | MP12 | 5,0 | 0,0146 |
| Moscatel | MP0 | 2,5 | 0,0216 |
| | MP4 | 2,5 | 0,0243 |
| | MP8 | 2,5 | 0,0234 |
| | MP12 | 2,5 | 0,0221 |

V.1.4. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO

Una vez finalizada la fermentación los vinos se clarificaron y estabilizaron por frío durante 3 semanas. Posteriormente se les realizó un análisis general para determinar la influencia de la maceración pelicular sobre la composición general de los mismos.

Como se puede observar en las Tablas 21 y 22, el tiempo de maceración influye de forma significativa sobre algunos parámetros característicos del vino. En primer lugar, se puede constatar que el grado alcohólico aumenta con el tiempo de maceración. Como vimos anteriormente en las Tablas 16 y 17, el °Bé de los mostos no se ve afectado por la maceración luego el incremento del grado alcohólico se debe a que la maceración conduce a una modificación del rendimiento estequiométrico alcohólico por parte de la levadura. Este fenómeno es aún más acusado en el caso de los vinos de *Moscatel de Alejandría*. Por tanto, la maceración pelicular conduce a vinos con mayor graduación alcohólica.

En segundo lugar, se puede observar para ambas variedades, que la tendencia al pardeamiento se incrementa de forma importante en las primeras 4 horas, coincidiendo con el máximo valor de IPT' (índice total de polifenoles) para luego disminuir de forma acusada a las 8 h (también ocurre con el IPT), y por último aumentar a las 12 horas alcanzando valores superiores a los iniciales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 21. Análisis general de los vinos procedentes de uva *Palomino fino* (Media \pm DS).

| | t mac. (horas) | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 |
| % v/v | 11,95 \pm 0,01 | 12,15 \pm 0,02 | 12,21 \pm 0,01 | 12,29 \pm 0,09 |
| Azúcares residuales (g/L) | 1,81 \pm 0,02 | 1,76 \pm 0,21 | 1,45 \pm 0,05 | 1,58 \pm 0,02 |
| Glicerina (g/L) | 6,31 \pm 0,92 | 6,49 \pm 0,04 | 6,39 \pm 0,94 | 6,57 \pm 0,52 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 4,99 \pm 0,02 | 4,74 \pm 0,05 | 4,65 \pm 0,03 | 5,13 \pm 0,17 |
| Acidez volátil (g/L ácido acético) | 0,252 \pm 0,002 | 0,275 \pm 0,010 | 0,241 \pm 0,001 | 0,227 \pm 0,001 |
| pH | 3,41 \pm 0,01 | 3,37 \pm 0,02 | 3,39 \pm 0,01 | 3,37 \pm 0,00 |
| IPT | 8,13 \pm 0,01 | 9,16 \pm 0,05 | 8,58 \pm 0,04 | 7,90 \pm 0,09 |
| Tendencia pardeamiento (DABS 470) | 0,052 \pm 0,002 | 0,065 \pm 0,002 | 0,047 \pm 0,001 | 0,054 \pm 0,002 |
| Na (mg/L) | 27,0 \pm 0,2 | 30,0 \pm 0,5 | 26,1 \pm 0,1 | 24,3 \pm 0,3 |
| K (mg/L) | 585 \pm 6 | 638 \pm 2 | 610 \pm 1 | 712 \pm 2 |
| Fe (mg/L) | 0,300 \pm 0,100 | 0,637 \pm 0,015 | 0,300 \pm 0,010 | 0,233 \pm 0,031 |
| Mg (mg/L) | 53,1 \pm 0,6 | 52,7 \pm 0,2 | 48,3 \pm 0,8 | 47,8 \pm 0,3 |
| Ca (mg/L) | 95,5 \pm 0,5 | 121,2 \pm 1,0 | 95 \pm 0,3 | 103,2 \pm 0,7 |
| Cu (mg/L) | 0,604 \pm 0,004 | 0,217 \pm 0,001 | 0,203 \pm 0,002 | 0,357 \pm 0,005 |
| Zn (mg/L) | 2,02 \pm 0,02 | 1,31 \pm 0,00 | 0,51 \pm 0,01 | 0,63 \pm 0,03 |

Estas oscilaciones se deben a la confluencia de dos fenómenos interdependientes: uno la extracción de polifenoles del hollejo al mosto, que conduce a un aumento del IPT y de la tendencia al pardeamiento; y otro, las reacciones de oxidación y polimerización de estos compuestos, que lleva consecuentemente a una disminución de los mismos. La preponderancia de uno u otro fenómeno dependen fundamentalmente de la concentración de oxígeno disuelto, el nivel de enzimas oxidasas y la temperatura.

De todos modos, las oscilaciones que se producen no son muy significativas y, en todo caso, los vinos producidos presentan valores de IPT por debajo de 10. Esto viene a corroborar los resultados de otros autores como Dubordieau y col. (1986), quienes

comprueban que las condiciones mecánicas de extracción del mosto y su turbidez después del desfangado estático influyen más en el contenido de polifenoles de los vinos blancos que la maceración pelicular. En estos casos algunos autores incluso recomiendan la hiperoxidación de los mostos para inducir a la degradación de flavanos y estabilizar los vinos con maceración frente al pardeamiento (Cheyner y col., 1989).

Tabla 22. Análisis general de los vinos procedentes de uva *Moscatel de Alejandría* (Media \pm DS).

| | t mac. (horas) | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 |
| % v/v | 12,04 \pm 0,04 | 12,65 \pm 0,04 | 12,97 \pm 0,04 | 13,66 \pm 0,03 |
| Azúcares residuales (g/L) | <0,5 | 2,08 \pm 0,22 | 1,13 \pm 0,33 | 0,5 \pm 0,02 |
| Glicerina (g/L) | 6,71 \pm 0,34 | 6,42 \pm 0,24 | 6,45 \pm 0,08 | 6,22 \pm 0,13 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 4,55 \pm 0,08 | 5,21 \pm 0,01 | 4,85 \pm 0,04 | 4,90 \pm 0,00 |
| Acidez volátil (g/L ácido acético) | 0,441 \pm 0,001 | 0,582 \pm 0,001 | 0,635 \pm 0,005 | 0,715 \pm 0,001 |
| pH | 3,56 \pm 0,01 | 3,52 \pm 0,02 | 3,58 \pm 0,02 | 3,56 \pm 0,01 |
| IPT | 7,12 \pm 0,02 | 7,11 \pm 0,01 | 6,73 \pm 0,02 | 7,20 \pm 0,03 |
| Tendencia pardeamiento (DABS 470) | 0,021 \pm 0,001 | 0,083 \pm 0,003 | 0,031 \pm 0,001 | 0,064 \pm 0,001 |
| Na (mg/L) | 42,6 \pm 0,4 | 26,1 \pm 0,2 | 63,3 \pm 0,4 | 42,1 \pm 0,2 |
| K (mg/L) | 838 \pm 2 | 934 \pm 1 | 883 \pm 2 | 895 \pm 1 |
| Fe (mg/L) | 0,900 \pm 0,010 | 0,405 \pm 0,005 | 0,406 \pm 0,005 | 0,363 \pm 0,011 |
| Mg (mg/L) | 57,7 \pm 0,2 | 60,1 \pm 0,1 | 55,7 \pm 0,7 | 57,2 \pm 0,3 |
| Ca (mg/L) | 70,6 \pm 0,4 | 103,2 \pm 0,8 | 103,3 \pm 0,8 | 113,4 \pm 1,2 |
| Cu (mg/L) | 1,94 \pm 0,01 | 0,204 \pm 0,005 | 0,207 \pm 0,007 | 0,204 \pm 0,003 |
| Zn (mg/L) | 5,81 \pm 0,15 | 3,13 \pm 0,05 | 1,33 \pm 0,03 | 1,07 \pm 0,05 |

En cuanto al resto de los parámetros (azúcares residuales, glicerina, acidez total, acidez volátil y pH), la maceración no parece influir en sus valores, sólo destacar que en los vinos de *Moscatel* se observa un aumento importante de la acidez volátil que puede deberse al desarrollo de bacterias lácticas que se han podido desarrollar por la presencia de elevadas concentraciones de ácido glucónico.

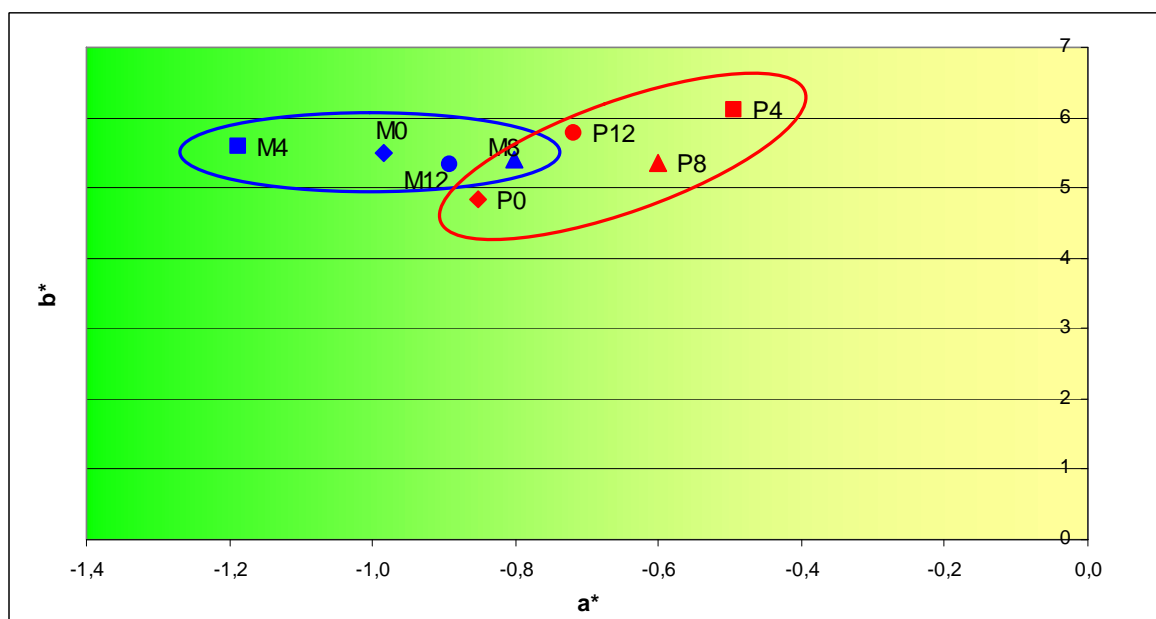
Por otra parte, en cuanto a los cationes estudiados se observa que los niveles de K aumentan a las 4 horas para después disminuir y volver a aumentar a las 12 horas, mientras que el Cu y el Zn disminuyen con el tiempo de maceración. Éste último aumenta con la fermentación en ambas variedades, sin embargo dicho aumento es menor cuanto más prolongada es la maceración.

V.1.5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO

En la Fig. 29 se observa la localización de las muestras de vinos de ambas variedades en el plano de color (a^*b^*) del espacio CIELAB. Mientras que en la Fig. 30 se representa los valores L^* (luminosidad o claridad) de las muestras frente a sus valores C^* (croma o saturación).

Las coordenadas CIELAB a^* (rojo/verde), b^* (amarillo/azul) y L^* definen el color de la muestra. La luminosidad es el atributo de una sensación visual según la cual un determinado estímulo visual parece estar más o menos iluminado, variando de claro (más iluminado) a oscuro (menos iluminado), es decir, indica la cantidad de luz blanca o negra con la que se mezcla el color. La coordenada C^* define el croma o la saturación y se relaciona con la mezcla de colores de manera que un color es saturado si es lo suficientemente puro y poco saturado si está muy mezclado.

Como se puede observar en la Fig. 29, el plano de coordenadas a^*b^* nos indica que todos los vinos presentan tonos amarillos con reflejos verdosos, siendo los de la variedad *Palomino*, y en particular los de tiempo de maceración de 4 h, los que presentan más tonos amarillos y los vinos de *Moscatel*, y en particular los de tiempo de maceración de 4 h, los más verdosos.



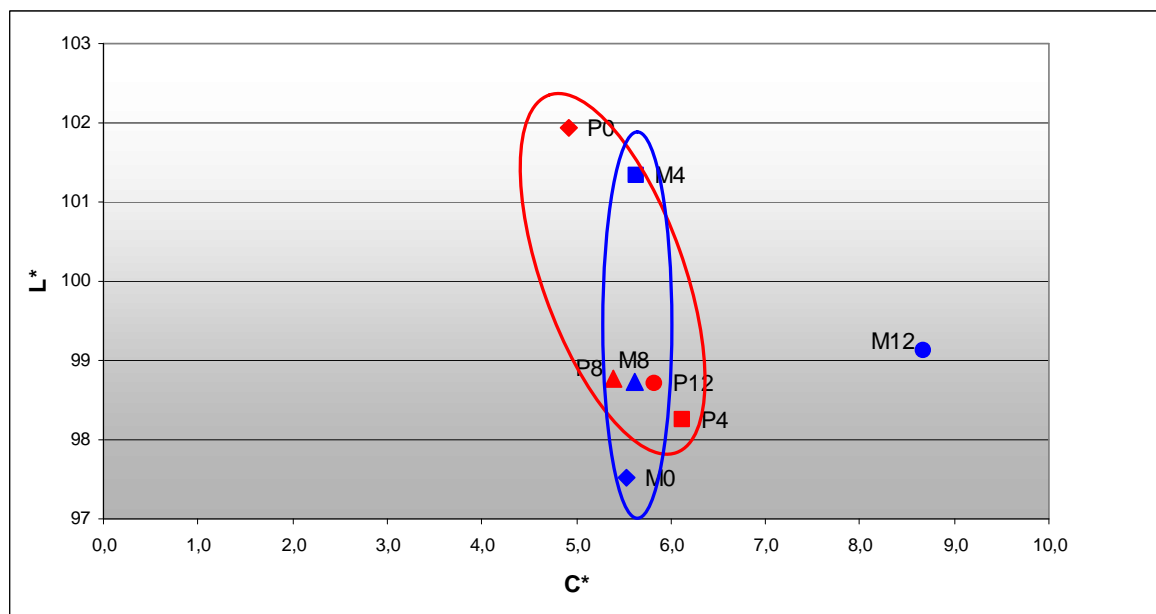
P: *Palomino fino*; M: *Moscatel de Alejandría*; 0, 4, 8 y 12: tiempo de maceración (h)

Fig.29. Representación de los vinos *Palomino fino* (rojo) y *Moscatel de Alejandría* (azul) en el plano de color a^*b^* del espacio CIELAB

En cuanto a la influencia del tiempo de maceración, observamos en el caso de los vinos de *Palomino* un aumento de la tonalidad amarilla y una ligera pérdida del reflejo verde en todos los casos pero sin correlación con el tiempo de maceración. Y en el caso de los vinos de *Moscatel* se observa una ligera disminución del reflejo verdoso, también sin correlación con el tiempo, con excepción de los de 4 h de maceración.

La luminosidad (L^*) y la saturación (C^*) (Fig. 30) nos muestran que todos los vinos tienen una luminosidad muy alta (97,5 y 102), resultando algunos de ellos especialmente pálidos (*Moscatel* 4 h y *Palomino* 0 h), sin embargo, en general presentan la misma intensidad cromática (entre 4,5 y 6,0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



P: *Palomino fino*; M: *Moscatel de Alejandría*; 0, 4, 8 y 12: tiempo de maceración (h)

Fig.30. Representación de los valores L^* de los vinos *Palomino fino* (rojo) y *Moscatel de Alejandría* (azul) frente a los valores C^*

En cuanto a la influencia del tiempo de maceración, no se observa correlación alguna con los parámetros L^* y C^* para ninguna de las variedades. Sin embargo, se puede observar, como en el caso anterior, que los vinos de *Palomino* macerados tienen una intensidad de color más alta (L^* más bajo) respecto al testigo sin macerar. Los vinos de *Moscatel* macerados presentan, sin embargo, menor intensidad de color que su correspondiente testigo.

Según Gómez-Míguez y col. (2006), el color aceptable para los vinos blancos se encuentra entre los valores de $L^* > 90$, a^* de -0,86 a 1,32 y b^* de 5,40 a 21,30 unidades CIELAB, luego atendiendo a esto los vinos de *Palomino* se encontrarían dentro de los valores aceptables, aunque la maceración conlleva a un aumento del color amarillo de mayor intensidad, lo cual está directamente relacionado con los valores más altos de IPT. Los de

Moscatel presentan, sin embargo, valores de a^* demasiado bajos incluso para los vinos macerados; es decir, presentan un color verde que se pierde con la maceración (excepto para las 4 horas), pero que mantiene a estos vinos por debajo del color aceptable según Gómez-Míguez y col. (2006).

V.1.6. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO

En este apartado se estudia la influencia de la maceración pelicular sobre los aromas mayoritarios, constituidos principalmente por el metanol, los alcoholes superiores y los compuestos carbonilo, y sobre los compuestos volátiles minoritarios, los cuales se han agrupado como: ácidos orgánicos, terpenos y derivados, alcoholes, ésteres, fenoles volátiles y tioles.

Por otra parte hay que tener en cuenta, que no todos los compuestos contribuyen por igual al perfil aromático de los vinos con lo cual hay que hacer especial énfasis en los valores olfativos de cada uno de ellos.

1.6.1. Influencia sobre el contenido compuestos volátiles mayoritarios

De entre los alcoholes más influenciados por la maceración pelicular destaca el metanol que, para ambos tipos de vinos, se incrementa de forma general a medida que aumenta el tiempo de maceración alcanzando niveles de prácticamente el doble de los iniciales a las 12 horas (Fig. 31 y 32). Para ambos tipos de vino, el contenido en metanol está directamente correlacionado con el tiempo de maceración mostrando un grado de correlación de 0,9000 y 0,9742 para los vinos de *Palomino* y *Moscatel* respectivamente. Es un hecho constatado por numerosos autores que con el tiempo de maceración se produce una mayor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

extracción de pectinas de las partes sólidas de la vendimia. Estas pectinas, por hidrólisis enzimática, dan origen al metanol en los vinos.

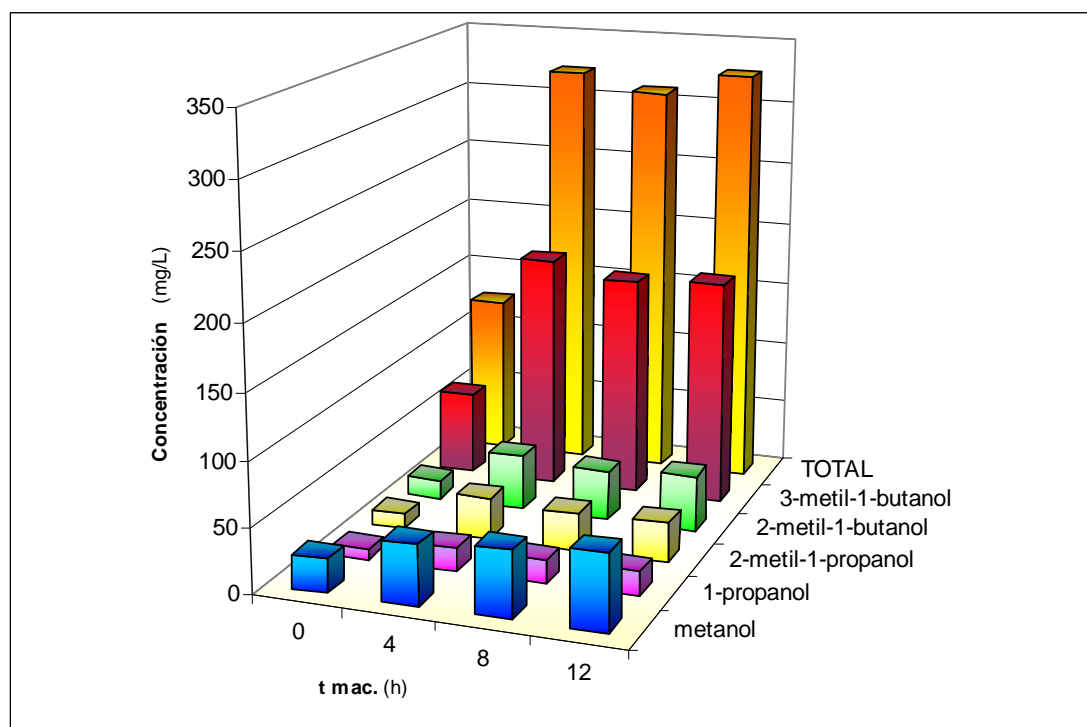


Figura 31. Influencia de la maceración pelicular sobre la concentración de metanol y alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Palomino fino*

En cuanto a los alcoholes superiores, la influencia de la maceración pelicular sobre estos compuestos no es la misma en ambas variedades. Mientras que para los vinos de *Moscatel* (Fig. 32) los alcoholes superiores se mantienen prácticamente invariables o aumentan ligeramente en el tiempo, en el caso de los vinos de *Palomino* (Fig. 31) se produce un aumento muy significativo de los mismos y, principalmente del 3-metil-1-butanol. Este aumento es más importante a las 4 horas de maceración; tras este período los niveles se mantienen o aumentan ligeramente. La influencia de la maceración pelicular sobre el contenido en alcoholes superiores se debe más al proceso de maceración que al tiempo de maceración, lo que podría

estar relacionado con el contenido en aminoácidos sobre el cual la maceración pelicular ejerce el mismo efecto (Guitart y col., 1997).

La razón de este comportamiento se debe a que los niveles de alcoholes superiores aumentan con la turbidez y con la carencia de nitrógeno asimilable. Ésta última conlleva a una acumulación de α -cetoácidos produciéndose cantidades importantes de los alcoholes correspondientes (Bayonove y col., 2000). Ambos fenómenos, como se veía en apartados anteriores, tienen lugar durante la maceración (acentuándose mucho más en el caso de los vinos de *Palomino fino*), lo que conlleva a un aumento del contenido total en alcoholes superiores en ambas variedades.

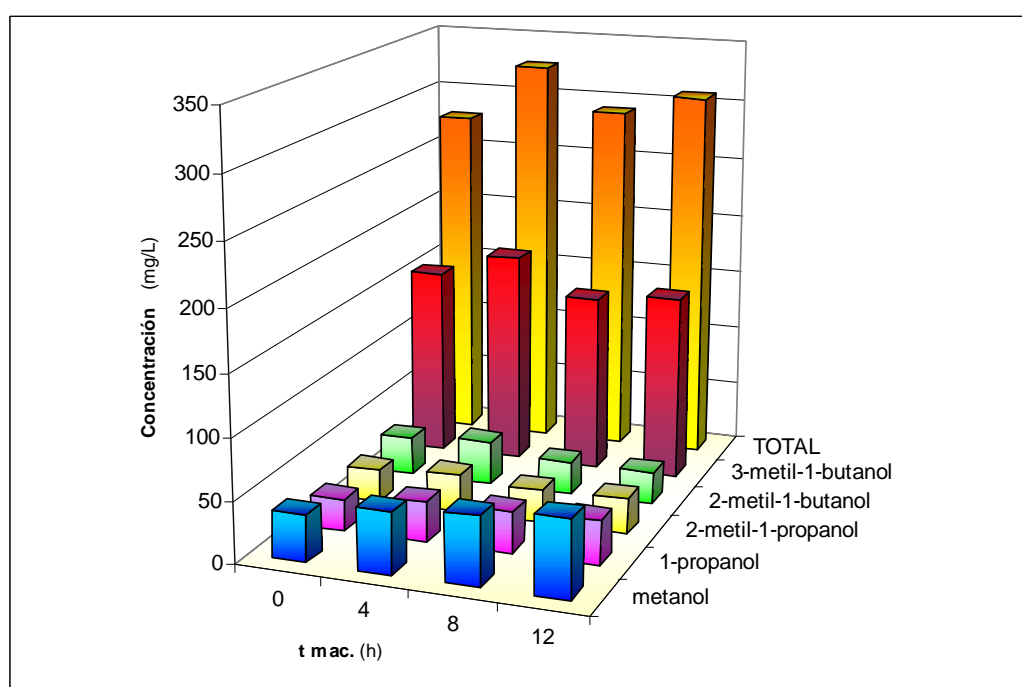


Fig. 32. Influencia de la maceración pelicular sobre la concentración de metanol y alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Moscatel de Alejandría*

A excepción del metanol y del n-propanol, los alcoholes superiores se forman a partir de sus correspondientes aminoácidos (valina, leucina e isoleucina), a través de los ácidos cetónicos y los aldehídos como productos intermedios (Pérez, 1979). Según Guitart y col.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(1997), tanto los mostos como los vinos *Chardonnay* procedentes de una maceración corta se caracterizan por un mayor nivel de isoleucina, valina y leucina entre otros. Luego un aumento del 3-metil-1-butanol podría deberse a que el contenido de leucina del mosto de *Palomino* aumenta con la maceración lo que conduce a una mayor síntesis del mismo y de ahí la acumulación del alcohol isoamílico. El contenido en aminoácidos de los mostos, su extracción durante la maceración y su evolución durante la fermentación dependen de la variedad de uva, de ahí que los resultados obtenidos en alcoholes superiores difieran para ambas variedades.

De todas maneras hay que señalar que a ninguno de los tiempos de maceración ensayados los niveles de alcoholes superiores superan los 350 mg/L, lo que nos indica que en ambos casos el desfogado ha sido cuidadoso (entre 50 y 300 NTU).

En cuanto a los compuestos carbonilo, como se observa en la Tabla 23, el acetato de etilo y el acetal son los más influenciados por el proceso de maceración de manera que se observa un aumento de los mismos en las primeras 4 horas para luego mantenerse en los mismos niveles. Dicho aumento es más significativo en el caso de los vinos de *Palomino*. El aumento de acetato de etilo con el proceso de maceración fue también observado por Falqué y Fernández (1996a) en vinos *Treixadura*.

Tabla 23. Concentración en compuestos carbonilo (mg/L) durante la maceración pelicular para los vinos de *Palomino* (Pno) y *Moscatel* (Moscat) (Valores medios \pm DS)

| Compuestos (mg/L) | tmac (horas) | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 0 | | 4 | | 8 | | 12 | |
| | Pno | Moscat | Pno | Moscat | Pno | Moscat | Pno | Moscat |
| Acetaldehído | 17 \pm 1,0 | 17 \pm 0,8 | 18 \pm 1,1 | 10 \pm 1,0 | 15 \pm 1,1 | 17 \pm 0,9 | 12 \pm 1,0 | 16 \pm 0,9 |
| Acetato de etilo | 8 \pm 1,2 | 24 \pm 1,5 | 19 \pm 1,0 | 31 \pm 1,0 | 19 \pm 1,4 | 24 \pm 1,2 | 18 \pm 1,0 | 27 \pm 1,0 |
| Acetal | ns | ns | 2 \pm 0,2 | ns | 2 \pm 0,1 | 2 \pm 0,4 | 1 \pm 1,0 | 2 \pm 0,2 |
| Total | 25 \pm 1,2 | 41 \pm 1,5 | 39 \pm 1,1 | 41 \pm 1,0 | 36 \pm 1,4 | 43 \pm 1,2 | 31 \pm 1,0 | 45 \pm 1,0 |

ns: no se detecta

El acetato de etilo a estas concentraciones (<50 mg/l), puede ser positivo y aportar complejidad al aroma; sin embargo, en concentraciones por encima de 150 mg/l, puede aportar al vino olor a vinagre (Amerine y Roessler, 1983).

1.6.2. Caracterización comparativa en aromas minoritarios de los vinos testigo de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

A diferencia de los alcoholes superiores, cuyos niveles en los vinos de ambas variedades son similares, el contenido en compuestos aromáticos minoritarios (Tabla 24) y su distribución con respecto al aroma total (Fig. 33) resultan un factor determinante para establecer diferencias claras entre los vinos control de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*. Por esa razón hemos visto conveniente e interesante, dado el valor de los datos, el realizar una caracterización comparativa en aromas minoritarios de ambos vinos.

La Fig. 33 muestra la distribución de aromas (%) para los vinos control de las dos variedades estudiadas. En dichas gráficas los distintos compuestos aromáticos se agrupan por familias químicas (ácidos, terpenos y derivados, alcoholes, fenoles volátiles, ésteres y tioles) y se representan expresando en tanto por ciento la relación entre el contenido total de aromas de cada una de las familias de aromas con respecto a la concentración total de aromas.

En los vinos control de la variedad *Palomino* la mayor parte de los compuestos aromáticos minoritarios está constituida por ácidos orgánicos y alcoholes, los cuales en su conjunto suponen de un 80-85% del contenido total de aromas. Por otra parte presentan un bajo contenido en ésteres (14,9%) y, tal y como cabía esperar, el contenido en terpenos y derivados no supera el 1%. Por otra parte, los vinos control de la variedad *Moscatel* presentan mayor proporción de ácidos orgánicos (50,2%) y compuestos terpénicos y derivados (13,4%) que los vinos de *Palomino*, sin embargo, la proporción de alcoholes y ésteres es mucho menor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(24,7 y 11,5% respectivamente). El resto de las familias aromáticas representan sólo una pequeña fracción del aroma.

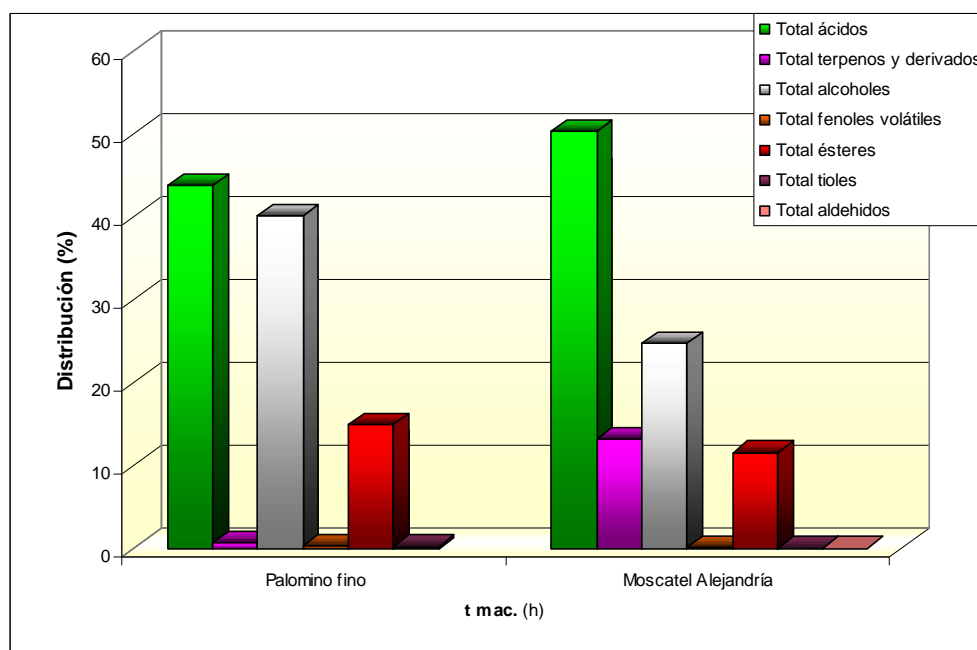


Fig. 33. Distribución de compuestos aromáticos minoritarios (%) en los vinos control de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*.

Aunque algunos autores señalan que en los vinos de *Moscatel* los terpenoles son muy abundantes (Dimitriadis y Williams, 1984; Günata y col., 1985), representando cerca del 40-50% de las sustancias volátiles detectables, en nuestro caso sólo representan un 15% del total de los aromas, sin embargo, la concentración total de los mismos está dentro de lo esperado (de 500 a más de 1700 $\mu\text{g/L}$).

En la composición de ácidos orgánicos de los vinos control de la variedad *Palomino*, las mayores concentraciones ($> 50 \mu\text{g/L}$) corresponden a los ácido hexanoico, octanoico, 10-undecenoico y geránico (Tabla 24). Por otra parte, en los vinos de la variedad *Moscatel*

predominan los mismos ácidos orgánicos a excepción del ácido geránico que aparece en más baja concentración y el ácido decanoico, que se encuentra a niveles $> 100 \mu\text{g/L}$.

Entre los alcoholes destacan el 1-hexanol y el 2-feniletanol (alcohol feniletilo) en los vinos de *Palomino* mientras que en los de *Moscatel* el 1-hexanol se presenta a bajas concentraciones, y entre los mayoritarios se encuentran el 2-feniletanol, el tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-piran-3-ol y el 3-etanolindol. El 2-feniletanol es sintetizado por las levaduras durante la fermentación (Bertrand, 1975; Sapis, 1967; Usseglio-Tomasset, 1967, 1971; Günata y col., 1986) y tiene como precursor al aminoácido fenilalanina.

La variedad *Palomino fino* se caracteriza por ser una variedad neutra, no floral, principalmente debido a la falta de compuestos terpénicos cuando se compara con otras variedades como la *Moscatel* (Genovés y col., 2005). Los terpenos se consideran como parte principal del aroma varietal diferenciando éstas entre sí (Rapp y col., 1980). De hecho, algunos autores (Schreier, 1979) consideran que lo primero que hay que tener en cuenta a la hora de clasificar variedades es el contenido en compuestos terpénicos ya que, entre vinos procedentes de distintas variedades, la diferencia en base a los terpenoles parece ser más significativa que la debida a la fracción volátil tras la fermentación (Baumes y col., 1994).

El contenido en terpenos y derivados terpénicos en los vinos de *Palomino* está representado por un derivado del linalol, el 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol y una pequeña fracción de citronelol. Según Genovés y col. (2005), el 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol es, junto con el geraniol, uno de los compuestos terpénicos mayoritarios de los mostos de *Palomino*, luego cabría esperar que fuera también uno de los componentes terpénicos mayoritarios en los vinos de dicha variedad aunque algunos de dichos compuestos, como el geraniol, se puede transformar durante la fermentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 24. Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos control *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*
(Valores medios \pm DS)

| | <i>Palomino fino</i> | <i>Moscatel de Alejandría</i> |
|---|---------------------------------------|--|
| ACIDOS | | |
| Isobutírico | 5,20 \pm 1,63 | ns |
| Isovalérico | 31,61 \pm 2,50 | 6,36 \pm 0,26 |
| Hexanoico | 392,03 \pm 4,37 | 400,95 \pm 31,95 |
| Heptanoico | 3,48 \pm 1,14 | 13,64 \pm 0,34 |
| Octanoico | 971,99 \pm 30,35 | 1443,47 \pm 172,34 |
| Decanoico | 27,99 \pm 10,67 | 1544,69 \pm 8,86 |
| 10-undecenoico | 52,84 \pm 15,49 | 113,27 \pm 1,24 |
| Geránico | 241,76 \pm 30,88 | 35,19 \pm 4,06 |
| Total ácidos | 1726,90 \pm 38,50 | 3557,58 \pm 327,42 |
| p.100 total | 43,67 | 50,24 |
| TERPENOS Y DERIVADOS | | |
| Linalool | ns | 109,91 \pm 8,17 |
| a-terpineol | ns | 78,65 \pm 6,83 |
| Citronelol | 4,12 \pm 0,31 | 50,84 \pm 3,01 |
| Nerol | ns | 10,92 \pm 5,02 |
| Geraniol | ns | 29,33 \pm 10,81 |
| trans-óxido de linalool | ns | 1,89 \pm 0,53 |
| cis-óxido linalool | ns | 7,18 \pm 2,84 |
| 6,7-dihidro-7-hidroxilinalol | ns | 11,46 \pm 1,64 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 24,35 \pm 0,73 | 525,50 \pm 109,26 |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | ns | 6,02 \pm 1,97 |
| 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol | ns | 106,31 \pm 39,59 |
| Total terpenos y derivados | 28,48 \pm 0,85 | 938,00 \pm 69,70 |
| p.100 total | 0,72 | 13,25 |
| ALCOHOLES | | |
| Isobutanol | 2,90 \pm 0,35 | ns |
| Isohexanol | 1,78 \pm 0,24 | ns |
| 3-metil-1-pentanol | 0,71 \pm 0,46 | 0,39 \pm 0,14 |
| 1-hexanol | 110,10 \pm 6,26 | 12,65 \pm 3,44 |
| trans-3-hexen-1-ol | 0,96 \pm 0,11 | ns |
| cis-3-hexen-1-ol | 6,95 \pm 0,71 | 0,67 \pm 0,66 |
| 1-octanol | 3,18 \pm 0,02 | 2,35 \pm 0,40 |
| 2-etilhexanol | ns | 1,17 \pm 0,14 |
| 3-etil-2-pentanol | ns | 0,48 \pm 0,36 |
| Nonanol | ns | 2,75 \pm 0,71 |
| Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-piran-3-ol | ns | 77,45 \pm 10,53 |
| Butoxietanol | ns | 11,67 \pm 3,03 |
| Alcohol feniletilo | 1457,09 \pm 32,53 | 1547,92 \pm 115,07 |
| 3-etanolindol | ns | 91,74 \pm 22,49 |
| Total alcoholes | 1583,68 \pm 99,58 | 1749,25 \pm 147,19 |
| p.100 total | 40,05 | 24,70 |
| FENOLES VOLÁTILES | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | 5,35 \pm 0,46 | ns |
| 2,6-diterbutil-4-etilfenol | 9,63 \pm 1,02 | 12,23 \pm 3,25 |
| Total fenoles volátiles | 14,98 \pm 0,46 | 12,23 \pm 2,97 |
| p.100 /total | 0,38 | 0,17 |

Tabla 24 (continuación). Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos control *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* (Valores medios \pm DS)

| (continuación) | <i>Palomino fino</i> | <i>Moscatel de Alejandría</i> |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| ÉSTERES | | |
| Acetato de isoamilo | 23,49 \pm 2,97 | 0,78 \pm 1,41 |
| Acetato de hexilo | 2,61 \pm 0,38 | 0,30 \pm 0,03 |
| Acetato de feniletilo | 83,66 \pm 6,09 | 289,14 \pm 60,91 |
| Butirato de etilo | 0,53 \pm 0,07 | ns |
| Hexanoato de etilo | 19,76 \pm 2,19 | 5,23 \pm 2,24 |
| Heptanoato de etilo | 0,19 \pm 0,01 | ns |
| Lactato de etilo | 1,47 \pm 0,05 | ns |
| Octanoato de etilo | 117,89 \pm 7,73 | 175,22 \pm 17,16 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 5,56 \pm 0,20 | 3,26 \pm 0,75 |
| 2-hidroxi-4-metilpentanoato de etilo | 6,83 \pm 0,52 | ns |
| Malonato de dietilo | 0,16 \pm 0,03 | ns |
| Decanoato de etilo | 21,21 \pm 4,90 | 166,99 \pm 39,37 |
| Succinato de dietilo | 50,81 \pm 3,00 | 67,78 \pm 12,99 |
| 9-Decenoato de etilo | 82,77 \pm 4,51 | 37,11 \pm 6,42 |
| Pentanoato de etilo | 168,91 \pm 9,81 | ns |
| 2-hexenoato de etilo | 0,27 \pm 0,09 | ns |
| Laurato de etilo | ns | 12,83 \pm 3,33 |
| Cinamato de etilo | 4,80 \pm 5,98 | 59,63 \pm 15,47 |
| Total ésteres | 590,94 \pm 16,74 | 818,26 \pm 97,83 |
| p.100 total | 14,94 | 11,56 |
| ALDEHIDOS | | |
| Nonanal | ns | 0,30 \pm 0,04 |
| Decanal | ns | 2,20 \pm 0,57 |
| Total aldehidos | 0,00 | 2,50 \pm 0,65 |
| p.100/total | 0,00 | 0,04 |
| TIOLES | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 9,13 \pm 0,64 | 2,96 \pm 0,23 |
| Total tioles | 9,13 \pm 0,64 | 2,96 \pm 0,23 |
| p.100/total | 0,23 | 0,04 |
| TOTAL AROMAS | 3954,09 \pm 72,13 | 7092,24 \pm 881,04 |

Como cabía esperar, en los vinos de *Moscatel*, sin embargo, el contenido terpénico es muy superior al de los vinos de *Palomino* y, además, dicho contenido está ampliamente representado por gran variedad de compuestos de entre los cuales el linalol, α -terpineol, citronelol y geraniol presentan mayor concentración, lo que confirma los resultados obtenidos por otros autores (Marois, 1983; Mateo y Jiménez, 2000; Selli y col., 2003). Por otra parte, también abundan los compuestos derivados del linalol entre los cuales destacan el 2,6-dimetil-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3,7-octadien-2,6-diol y el 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol que se encuentran a concentraciones superiores a los 100 µg/L.

Según López-Tamames y col. (1997) (Genovés y col., 2005), en algunas variedades gallegas y mediterráneas, la concentración de geraniol varía entre 2 y 24 µg/L, mientras que 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol se encuentra entre 1 y 64 µg/L. En la variedad *Moscatel* cultivada en nuestra zona, los niveles de ambos compuestos son muy superiores a los esperados, lo que podría estar relacionado con el clima cálido característico de esta zona.

La variedad *Moscatel de Alejandría* está considerada como una variedad muy aromática por ser rica en terpenoles pero, además, a diferencia de otras variedades aromáticas, los compuestos terpénicos se distribuyen prácticamente de la misma manera en las diferentes partes de la baya. Así, los terpenos libres se encuentran repartidos entre la pulpa y el hollejo (50%) o mayoritariamente en el hollejo (90% nerol y geraniol), mientras que los terpenoglucósidos se encuentran localizados mayoritariamente en el hollejo (Hidalgo, 2006). Durante la fermentación alcohólica los compuestos terpénicos se pueden degradar por: transformación en otros compuestos, adsorción por las paredes celulares de las levaduras o simple eliminación parcial de formas volátiles por el gas de fermentación (Díaz-Cervantes, 1999), sin embargo, la concentración de terpenos y derivados sigue siendo alta tras la fermentación dando lugar a vinos aromáticos en los que resaltan las características propias de la variedad.

En cuanto al contenido en ésteres, éste representa al mayor grupo de compuestos identificados. En ambos tipos de vinos (Tabla 24), los mayores niveles se observan para el acetato de feniletilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo y 9-decanoato de etilo. Aunque en los vinos de *Palomino* también destacan el acetato de isoamilo y el pentanoato de etilo, éste último alcanza niveles superiores a los 150 µg/L. Asimismo, en los vinos de *Moscatel* el cinamato de etilo alcanza niveles de hasta 60 µg/L.

1.6.3. Influencia de la maceración en el contenido de compuestos volátiles minoritarios

En los vinos macerados se observan también claras diferencias en cuanto a la distribución de componentes volátiles minoritarios entre ambas variedades (Fig. 34 y 35). Así, en los vinos de *Palomino* se incrementa la proporción de ácidos y ésteres con la maceración en un 4% aproximadamente (Fig. 34), mientras que la de alcoholes disminuye (7%) y el resto se mantienen. Dentro del grupo de los ácidos son el decanoico (450%) y el 10-undecenoico (443%) los que más contribuyen al aumento de la concentración de ácidos orgánicos durante la maceración, aportando fundamentalmente aromas a madera y oxidación. El ácido hexanoico (aroma herbáceo) y el ácido octanoico sólo aumentan un 8 y 1,2% respectivamente. Sin embargo, existen ácidos que disminuyen como el ácido geránico (-77,8%), el isobutírico (-47,9 %) y el isovalérico (-37,6%) que, junto con el ácido octanoico aportan aromas lácticos a los vinos.

Por otro lado, la proporción de alcoholes disminuye con la maceración debido principalmente a la disminución del componente mayoritario dentro de este grupo, el 2-feniletanol (alcohol feniletilo). El 2-feniletanol se forma por acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica a partir del aminoácido 2-fenilalanina (mecanismo de Erlich) (Selli y col., 2006b). Este resultado no concuerda con el hecho de que la 2-fenilalanina se encuentre mayoritariamente presente en el hollejo.

En nuestro caso, con la técnica de maceración y, por el contrario de lo que observan otros autores para los vinos de *Palomino* (Varcárcel, 2006), el 2-feniletanol disminuye en un -16,4%. Según Hernández-Orte y col. (2005), mayores niveles de NFA en el mosto conducen a niveles más bajos de metionol (-70%), 2-feniletanol (-65%) y alcohol isoamílico (-40-65%) y a más altos niveles de ácido propanoico en los vinos. Luego, la disminución de metionol (3-metiltio-1-propanol) y 2-feniletanol en los vinos de *Palomino* podría estar relacionada con la disminución nitrógeno asimilable que se observa en los mostos macerados (Tabla 16) y sobre

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

todo a la disminución de aminoácidos, ya que el tipo de nitrógeno (amonio o aminoácidos) también va a influir en la formación de volátiles.

Tabla 25. Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Palomino fino* a los distintos tiempos de maceración (Valores medios \pm DS)

| | 0 | 4 | 8 | 12 |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| ACIDOS | | | | |
| Isobutírico | 5,20 \pm 1,63 | 2,5 \pm 0,37 | 2,23 \pm 0,76 | 2,71 \pm 0,81 |
| Isovalérico | 31,61 \pm 2,50 | 22,31 \pm 1,66 | 16,66 \pm 0,66 | 19,71 \pm 0,58 |
| Hexanoico | 392,03 \pm 4,37 | 431,48 \pm 10,79 | 381,09 \pm 2,42 | 423,36 \pm 14,36 |
| Heptanoico | 3,48 \pm 1,14 | 5,55 \pm 0,19 | 4,88 \pm 0,07 | 4,90 \pm 0,07 |
| Octanoico | 971,99 \pm 30,35 | 993,69 \pm 25,31 | 967,12 \pm 3,75 | 984,04 \pm 35,21 |
| Decanoico | 27,99 \pm 10,67 | 128,59 \pm 7,21 | 46,12 \pm 4,01 | 153,78 \pm 1,76 |
| 10-undecenoico | 52,84 \pm 15,49 | 156,62 \pm 12,49 | 124,73 \pm 10,37 | 287,84 \pm 25,14 |
| Geránico | 241,76 \pm 30,88 | 54,45 \pm 7,52 | 42,99 \pm 3,73 | 53,62 \pm 3,83 |
| Total ácidos | 1726,90 \pm 38,50 | 1795,19 \pm 7,52 | 1585,81 \pm 3,83 | 1929,98 \pm 3,73 |
| p.100 total | 43,67 | 46,29 | 46,69 | 47,30 |
| TERPENOS Y DERIVADOS | | | | |
| Citronelol | 4,12 \pm 0,31 | 4,31 \pm 0,29 | 2,90 \pm 0,48 | 4,38 \pm 0,64 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 24,35 \pm 0,73 | 23,97 \pm 1,05 | 19,71 \pm 0,25 | 22,93 \pm 0,10 |
| Total terpenos y derivados | 28,48 \pm 0,85 | 28,29 \pm 1,15 | 22,61 \pm 0,54 | 27,31 \pm 0,33 |
| p.100 total | 0,72 | 0,73 | 0,67 | 0,67 |
| ALCOHOLES | | | | |
| Isobutanol | 2,90 \pm 0,35 | 0,97 \pm 0,33 | 1,65 \pm 0,28 | 1,84 \pm 0,35 |
| Isohexanol | 1,78 \pm 0,24 | 1,31 \pm 0,09 | 1,47 \pm 0,12 | 1,35 \pm 0,14 |
| 3-metil-1-pentanol | 0,71 \pm 0,46 | 4,42 \pm 0,17 | 4,82 \pm 0,06 | 4,71 \pm 0,11 |
| 1-hexanol | 110,10 \pm 6,26 | 92,66 \pm 0,25 | 100,42 \pm 0,52 | 103,75 \pm 0,09 |
| trans-3-hexen-1-ol | 0,96 \pm 0,11 | 0,50 \pm 0,02 | 0,51 \pm 0,21 | 0,52 \pm 0,01 |
| cis-3-hexen-1-ol | 6,95 \pm 0,71 | 5,11 \pm 0,26 | 4,49 \pm 0,03 | 4,81 \pm 0,05 |
| 1-octanol | 3,18 \pm 0,02 | 2,73 \pm 0,04 | 2,65 \pm 0,12 | 3,03 \pm 0,18 |
| Alcohol feniletilo | 1457,09 \pm 32,53 | 1286,68 \pm 15,32 | 938,30 \pm 43,57 | 1218,67 \pm 58,06 |
| Total alcoholes | 1583,68 \pm 99,58 | 1394,38 \pm 119,70 | 1054,31 \pm 70,90 | 1338,67 \pm 154,59 |
| p.100 total | 40,05 | 35,96 | 31,04 | 32,81 |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | 5,35 \pm 0,46 | 9,01 \pm 1,86 | 9,54 \pm 2,02 | 13,93 \pm 2,93 |
| 2,6-diterbutil-4-etilfenol | 9,63 \pm 1,02 | 8,39 \pm 0,21 | 7,64 \pm 0,56 | 8,74 \pm 0,93 |
| Total fenoles volátiles | 14,98 \pm 0,46 | 17,40 \pm 1,31 | 17,18 \pm 1,81 | 22,66 \pm 1,91 |
| p.100 /total | 0,38 | 0,45 | 0,51 | 0,56 |

Tabla 25 (continuación). Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Palomino fino* a los distintos tiempos de maceración (Valores medios \pm DS)

| (continuación) | 0 | 4 | 8 | 12 |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| ÉSTERES | | | | |
| Acetato de isoamilo | 23,49 \pm 2,97 | 11,74 \pm 0,02 | 27,21 \pm 2,34 | 20,04 \pm 1,53 |
| Acetato de hexilo | 2,61 \pm 0,38 | 2,93 \pm 0,56 | 4,38 \pm 0,36 | 2,89 \pm 0,34 |
| Acetato de feniletilo | 83,66 \pm 6,09 | 83,81 \pm 7,26 | 80,55 \pm 2,00 | 69,25 \pm 6,58 |
| Butirato de etilo | 0,53 \pm 0,07 | 0,12 \pm 0,05 | 0,51 \pm 0,03 | 0,56 \pm 0,12 |
| Hexanoato de etilo | 19,76 \pm 2,19 | 19,46 \pm 0,58 | 36,33 \pm 2,79 | 31,25 \pm 2,56 |
| Heptanoato de etilo | 0,19 \pm 0,01 | 0,19 \pm 0,04 | 0,25 \pm 0,03 | 0,28 \pm 0,04 |
| Lactato de etilo | 1,47 \pm 0,05 | 0,81 \pm 0,36 | 0,91 \pm 0,23 | 1,15 \pm 0,35 |
| Octanoato de etilo | 117,89 \pm 7,73 | 157,57 \pm 4,45 | 238,61 \pm 23,05 | 257,98 \pm 26,93 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 5,56 \pm 0,20 | 5,73 \pm 0,23 | 5,32 \pm 0,16 | 6,63 \pm 0,16 |
| 2-hidroxi-4-metilpentanoato de etilo | 6,83 \pm 0,52 | 5,67 \pm 0,50 | 5,50 \pm 0,47 | 6,03 \pm 0,29 |
| Malonato de dietilo | 0,16 \pm 0,03 | 0,19 \pm 0,01 | 0,19 \pm 0,02 | 0,18 \pm 0,01 |
| Decanoato de etilo | 21,21 \pm 4,90 | 27,11 \pm 2,34 | 40,20 \pm 6,71 | 36,82 \pm 7,43 |
| Succinato de dietilo | 50,81 \pm 3,00 | 51,92 \pm 3,04 | 44,35 \pm 4,55 | 64,81 \pm 4,51 |
| 9-Decenoato de etilo | 82,77 \pm 4,51 | 100,84 \pm 4,55 | 108,30 \pm 0,63 | 106,09 \pm 0,52 |
| Pentadecanoato de etilo | 168,91 \pm 9,81 | 156,03 \pm 3,58 | 118,64 \pm 16,92 | 147,11 \pm 3,47 |
| Caproato de isoamilo | ns | 0,16 \pm 0,07 | 0,19 \pm 0,10 | 0,24 \pm 0,03 |
| 2-hexenoato de etilo | 0,27 \pm 0,09 | 0,13 \pm 0,03 | 0,24 \pm 0,01 | 0,17 \pm 0,06 |
| Cinamato de etilo | 4,80 \pm 5,98 | 11,30 \pm 6,79 | ns | 4,72 \pm 2,99 |
| Total ésteres | 590,94 \pm 16,74 | 635,71 \pm 37,83 | 711,69 \pm 11,16 | 756,18 \pm 39,41 |
| p.100 total | 14,94 | 16,39 | 20,95 | 18,53 |
| TIOLES | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 9,13 \pm 0,64 | 6,98 \pm 0,72 | 4,90 \pm 0,39 | 5,57 \pm 0,74 |
| Total tioles | 9,13 \pm 0,64 | 6,98 \pm 0,72 | 4,90 \pm 0,39 | 5,57 \pm 0,74 |
| p.100/total | 0,23 | 0,18 | 0,14 | 0,14 |
| TOTAL AROMAS | 3954,09 \pm 72,13 | 3877,95 \pm 16,6 | 3396,49 \pm 67,40 | 4080,36 \pm 147,32 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 26. Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Moscatel de Alejandría* a los distintos tiempos de maceración (Valores medios \pm DS)

| | 0 | 4 | 8 | 12 |
|---|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| ACIDOS | | | | |
| Isovalérico | 6,36 \pm 0,26 | 3,96 \pm 0,44 | 7,34 \pm 0,09 | 5,40 \pm 0,07 |
| Hexanoico | 400,95 \pm 31,95 | 207,67 \pm 36,64 | 414,15 \pm 8,21 | 378,77 \pm 35,20 |
| Heptanoico | 13,64 \pm 0,34 | 4,06 \pm 0,48 | 4,24 \pm 0,13 | 3,39 \pm 0,44 |
| Octanoico | 1443,47 \pm 172,34 | 761,62 \pm 59,96 | 1173,35 \pm 102,33 | 1226,87 \pm 189,45 |
| Decanoico | 1544,69 \pm 8,86 | 20,63 \pm 4,38 | 137,42 \pm 21,07 | 41,78 \pm 5,91 |
| 10-undecenoico | 113,27 \pm 1,24 | 16,72 \pm 2,83 | 60,15 \pm 4,68 | 33,10 \pm 1,68 |
| Geránico | 35,19 \pm 4,06 | 46,90 \pm 18,67 | 110,67 \pm 22,73 | 132,01 \pm 22,52 |
| Total ácidos | 3557,58 \pm 327,42 | 1061,56 \pm 43,44 | 1907,33 \pm 95,02 | 1821,31 \pm 185,81 |
| p.100 total | 50,24 | 33,64 | 36,65 | 36,73 |
| TERPENOS Y DERIVADOS | | | | |
| Linalol | 109,91 \pm 8,17 | 108,88 \pm 3,71 | 166,24 \pm 21,40 | 176,02 \pm 24,2 |
| α -terpineol | 78,65 \pm 6,83 | 63,54 \pm 15,71 | 99,82 \pm 24,83 | 101,49 \pm 23,51 |
| Citronelol | 50,84 \pm 3,01 | 41,92 \pm 14,30 | 72,29 \pm 36,66 | 68,46 \pm 29,46 |
| Nerol | 10,92 \pm 5,02 | 12,46 \pm 5,46 | 22,25 \pm 0,60 | 23,48 \pm 1,46 |
| Geraniol | 29,33 \pm 10,81 | 14,04 \pm 4,71 | 30,52 \pm 19,25 | 42,22 \pm 1,63 |
| trans-óxido de linalool | 1,89 \pm 0,53 | 1,89 \pm 0,18 | 2,82 \pm 0,18 | 2,94 \pm 0,57 |
| cis-óxido linalool | 7,18 \pm 2,84 | 6,43 \pm 1,79 | 10,01 \pm 3,10 | 10,11 \pm 1,44 |
| 6,7-dihidro-7-hidroxilinalol | 11,46 \pm 1,64 | 7,53 \pm 0,68 | 13,57 \pm 0,22 | 9,92 \pm 3,50 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 525,50 \pm 109,26 | 260,96 \pm 94,17 | 490,43 \pm 101,56 | 381,65 \pm 79,55 |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | 6,02 \pm 1,97 | 3,35 \pm 4,10 | 7,22 \pm 3,22 | 7,10 \pm 1,33 |
| 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol | 106,31 \pm 39,59 | 30,54 \pm 27,50 | 51,36 \pm 26,53 | 61,44 \pm 14,09 |
| Total terpenos y derivados | 938,00 \pm 69,70 | 551,54 \pm 56,00 | 966,54 \pm 27,21 | 884,86 \pm 3,01 |
| p.100 /total | 13,25 | 17,48 | 18,57 | 17,85 |
| ALCOHOLES | | | | |
| Isobutanol | ns | 0,15 \pm 0,62 | 0,31 \pm 1,97 | 0,35 \pm 0,59 |
| Isohexanol | ns | 0,35 \pm 0,12 | 0,21 \pm 0,13 | 0,21 \pm 0,24 |
| 3-metil-1-pentanol | 0,39 \pm 0,14 | 1,17 \pm 0,30 | 0,75 \pm 0,32 | 0,75 \pm 0,10 |
| 1-hexanol | 12,65 \pm 3,44 | 22,90 \pm 1,59 | 39,61 \pm 2,13 | 35,34 \pm 4,86 |
| trans-3-hexen-1-ol | ns | 0,11 \pm 0,02 | 0,17 \pm 0,01 | 0,20 \pm 0,02 |
| cis-3-hexen-1-ol | 0,67 \pm 0,66 | 1,30 \pm 0,57 | 2,40 \pm 0,70 | 2,15 \pm 0,83 |
| 1-octen-3-ol | ns | 0,56 \pm 0,06 | 0,41 \pm 0,13 | 0,48 \pm 0,27 |
| 1-octanol | 2,35 \pm 0,40 | 2,53 \pm 0,45 | 3,79 \pm 0,09 | 3,52 \pm 0,20 |
| 2-etilhexanol | 1,17 \pm 0,14 | 0,95 \pm 0,08 | 0,92 \pm 0,02 | 0,88 \pm 0,04 |
| 3-etil-2-pentanol | 0,48 \pm 0,36 | 0,69 \pm 0,18 | 0,93 \pm 0,45 | 1,38 \pm 0,43 |
| Nonanol | 2,75 \pm 0,71 | 2,48 \pm 0,64 | 2,65 \pm 0,69 | ns |
| Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-piran-3-ol | 77,45 \pm 10,53 | 45,11 \pm 2,86 | 83,10 \pm 11,12 | 71,73 \pm 8,84 |
| Butoxietanol | 11,67 \pm 3,03 | 2,99 \pm 0,78 | ns | ns |
| Alcohol feniletilo | 1547,92 \pm 115,07 | 717,59 \pm 42,21 | 1113,34 \pm 10,30 | 939,99 \pm 75,71 |
| 3-etanolindol | 91,74 \pm 22,49 | 71,94 \pm 33,29 | 99,28 \pm 25,77 | 30,22 \pm 7,84 |
| Total alcoholes | 1749,25 \pm 147,19 | 870,83 \pm 22,49 | 1347,88 \pm 33,29 | 1087,21 \pm 84,82 |
| p.100/total | 24,70 | 27,60 | 25,90 | 21,93 |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | ns | 2,08 \pm 0,23 | 2,63 \pm 0,17 | 2,11 \pm 0,55 |
| 2,6-diterbutil-4-etilfenol | 12,23 \pm 3,25 | 5,93 \pm 1,54 | 9,68 \pm 2,51 | 7,60 \pm 1,97 |
| Total fenoles volátiles | 12,23 \pm 2,97 | 8,00 \pm 1,77 | 12,31 \pm 2,68 | 9,71 \pm 2,52 |
| p.100 /total | 0,17 | 0,25 | 0,24 | 0,20 |

ns: no se detecta

Tabla 26 (continuación). Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Moscatel de Alejandría* a los distintos tiempos de maceración (Valores medios \pm DS)

| (continuación) | 0 | 4 | 8 | 12 |
|----------------------------|--|---------------------------------------|--|--|
| ÉSTERES | | | | |
| Acetato de isoamilo | 0,78 \pm 1,41 | 47,64 \pm 9,51 | 65,27 \pm 14,78 | 126,31 \pm 31,36 |
| Acetato de hexilo | 0,30 \pm 0,03 | 2,15 \pm 0,50 | 4,25 \pm 1,49 | 5,82 \pm 1,06 |
| Acetato de cis-hexenilo | ns | 0,26 \pm 0,07 | 0,48 \pm 0,12 | 0,70 \pm 0,18 |
| Acetato de feniletilo | 289,14 \pm 60,91 | 148,05 \pm 26,78 | 243,11 \pm 56,15 | 255,09 \pm 62,13 |
| Butirato de etilo | ns | 0,34 \pm 0,04 | 0,50 \pm 0,03 | 0,76 \pm 0,13 |
| Hexanoato de etilo | 5,23 \pm 2,24 | 43,60 \pm 5,70 | 51,99 \pm 9,90 | 84,75 \pm 16,59 |
| Heptanoato de etilo | ns | 0,20 \pm 0,07 | 0,17 \pm 0,01 | 0,15 \pm 0,07 |
| 2-hexenoato de etilo | ns | 0,13 \pm 0,03 | 0,15 \pm 0,4 | 0,18 \pm 0,5 |
| Lactato de etilo | ns | 0,10 \pm 0,03 | 0,13 \pm 0,08 | 0,12 \pm 0,03 |
| Octanoato de etilo | 175,22 \pm 17,16 | 209,05 \pm 25,26 | 335,13 \pm 26,53 | 414,71 \pm 42,38 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 3,26 \pm 0,75 | 3,47 \pm 0,22 | 4,05 \pm 0,05 | ns |
| Malonato de dietilo | ns | 0,21 \pm 0,06 | 0,28 \pm 0,07 | 0,34 \pm 0,06 |
| Decanoato de etilo | 166,99 \pm 39,37 | 20,19 \pm 2,60 | 28,59 \pm 4,05 | 36,55 \pm 7,45 |
| Succinato de dietilo | 67,78 \pm 12,99 | 67,21 \pm 28,24 | 72,54 \pm 7,74 | 74,93 \pm 15,14 |
| 9-Decenoato de etilo | 37,11 \pm 6,42 | 35,05 \pm 3,60 | 33,62 \pm 4,33 | 35,39 \pm 2,16 |
| 2-etilhexanoato de metilo | ns | 60,09 \pm 8,25 | 97,23 \pm 0,44 | 88,86 \pm 5,96 |
| Laurato de etilo | 12,83 \pm 3,33 | 3,12 \pm 0,81 | 2,36 \pm 0,88 | 3,38 \pm 0,61 |
| Cinamato de etilo | 59,63 \pm 15,47 | 19,77 \pm 5,13 | 26,33 \pm 6,83 | 23,93 \pm 6,21 |
| Total ésteres | 818,26 \pm 97,83 | 660,65 \pm 44,18 | 966,19 \pm 76,11 | 1151,97 \pm 93,57 |
| p.100/total | 11,56 | 20,94 | 18,57 | 23,23 |
| ALDEHIDOS | | | | |
| Nonanal | 0,30 \pm 0,04 | 0,11 \pm 0,04 | 0,17 \pm 0,03 | 0,15 \pm 0,08 |
| Decanal | 2,20 \pm 0,57 | 0,76 \pm 0,20 | 0,82 \pm 0,21 | 0,82 \pm 0,21 |
| Total aldehidos | 2,50 \pm 0,65 | 0,86 \pm 0,22 | 1,00 \pm 0,26 | 0,97 \pm 0,25 |
| p.100/total | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,02 |
| TIOLES | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 2,96 \pm 0,23 | 2,21 \pm 0,05 | 2,73 \pm 0,01 | 2,12 \pm 0,02 |
| Total tioles | 2,96 \pm 0,23 | 2,21 \pm 0,05 | 2,73 \pm 0,01 | 2,12 \pm 0,02 |
| p.100/total | 0,04 | 0,07 | 0,05 | 0,04 |
| TOTAL AROMAS | 7092,24 \pm 881,04 | 3163,19 \pm 69,15 | 5217,56 \pm 379,31 | 4968,07 \pm 668,82 |

ns: no se detecta

Actualmente, existen bastantes discrepancias entre diferentes autores sobre el contenido en aminoácidos de los mostos macerados. Así, mientras que Guitart y col. (1997) afirman que la maceración aumenta el contenido en aminoácidos de los mostos, Hernández-Orte y col. (1998) observan el fenómeno contrario en mostos de *Macabeo*. En principio cabría esperar que la maceración favoreciera la extracción de nitrógeno, sobre todo aminoácidos, del hollejo; sin embargo, puede ocurrir que dichos aminoácidos se combinen con otros componentes del hollejo extraídos durante la maceración, sobre todo los más reactivos, lo que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

conllevaría a una disminución de su contenido en los mostos macerados tras el desfangado. Este fenómeno se produciría únicamente en algunas variedades o incluso en función de la temperatura, de ahí que se observen discrepancias en la bibliografía. Una disminución de la 2-fenilalanina por este motivo conllevaría a un menor contenido en 2-feniletanol tras la fermentación.

Por otra parte, hay que señalar que los compuestos con carácter herbáceo, representados por el 1-hexanol, el trans-3-hexen-1-ol y el cis-3-hexen-1-ol no se modifican durante la maceración, incluso disminuyen ligeramente. Esto es un aspecto interesante a destacar que no ocurre con todas las variedades independientemente de que se haga un buen desfangado.

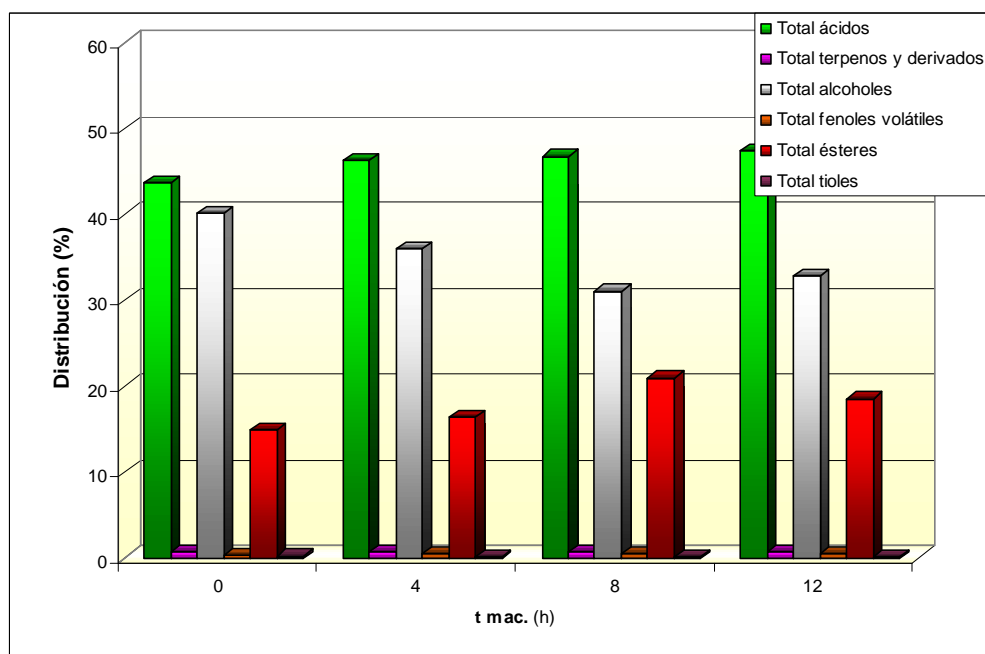


Fig. 34. Distribución de compuestos aromáticos minoritarios (%) en vinos de *Palomino fino* con diferentes tiempos de maceración

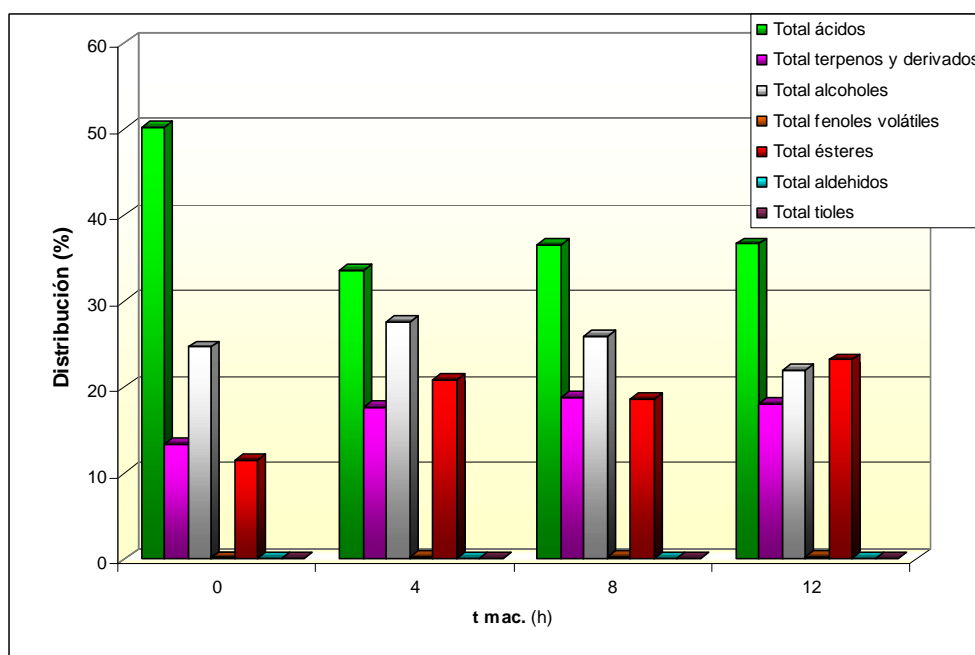


Fig. 35. Distribución de compuestos aromáticos minoritarios (%) en vinos de *Moscatel de Alejandria* con diferentes tiempos de maceración

Según Du-Plessis (1975) (Suárez-Lepe, 2002), los ésteres, y más concretamente el octanoato de etilo, son responsables directos de la calidad de los vinos jóvenes, contribuyendo al carácter afrutado de los mismos. Como se observa en la Tabla 25, en los vinos *Palomino* se produce un aumento del octanoato de etilo (118,8%) con el tiempo de maceración, seguido del decanoato de etilo (73,6%), hexanoato de etilo (58,1%), succinato de dietilo (27,5%) y 9-decenoato de etilo (28,2%), lo cual contribuye a un aumento general de la proporción de ésteres.

En los vinos de *Moscatel* (Fig. 35), parece afectar más el proceso de maceración en sí que el tiempo de maceración ya que a los mayores cambios se observan a las 4 horas de maceración. A dicho tiempo disminuye la proporción de ácidos (aproximadamente un -18%), y aumentan la proporción de alcoholes (3%), terpenos (4%) y ésteres (9,4%). A las 8 horas de maceración se produce un incremento de la proporción de ácidos y terpenos pero disminuyen

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ligeramente la proporción de alcoholes y ésteres. A las 12 horas la proporción de ácidos y terpenos se mantienen mientras que disminuyen la proporción de alcoholes y aumenta la de ésteres. Como resultado global se podría hablar de una disminución de la proporción de ácidos y alcoholes con el tiempo de maceración y un aumento de los compuestos terpénicos y derivados y los ésteres, aunque según el tiempo de maceración se pueden producir ligeras variaciones.

En cuanto al porcentaje de ácidos, como se observa en la Tabla 26, la disminución de la proporción de ácidos se debe a una disminución generalizada de todos los ácidos viéndose mayormente afectados el ácido 10-undecenoico (-70,8%) y el ácido decanoico (-97,3%), la cual no se ve compensada con el aumento del ácido geránico (275,1%). Comparando el comportamiento de estos tres ácidos con la maceración en ambas variedades, observamos que siguen una evolución contraria, lo que confirma que la influencia de la maceración pelicular sobre la composición aromática de los vinos está claramente influenciada por la variedad.

Tal y como afirman Baumes y col. (1988), los terpenos son compuestos característicos de la variedad que se extraen durante la maceración pelicular de las partes sólidas de la baya. Aumentan durante la maceración, siendo mayor este incremento para el linalol (60%), el nerol (115%) y el geraniol (43,9%). El resto de terpenoles, α -terpineol y citronelol también aumentan, pero lo hacen en menor proporción (29 y 34,7% respectivamente). Asimismo, se produce una disminución considerable de los derivados terpénicos del linalol, más acusada en el caso del 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol (-42,2%).

Estos resultados nos indican que, con el proceso de maceración se favorece la extracción y difusión de compuestos terpénicos de la pulpa (linalol) y hollejo (linalol, nerol y geraniol) al mosto y, como consecuencia, se favorece su presencia en el vino.

En cuanto a la proporción de alcoholes, en los vinos de *Moscatel* los alcoholes que aparecen en mayor concentración son el 2-feniletanol y el 3-etanolindol, los cuales disminuyen

considerablemente con la maceración (39,3 y 67,0% respectivamente). El 3-etanolindol es un precursor del ácido indolacético derivado del aminoácido triptófano y que en las uvas y vinos se transformarían en o-aminoacetofenona (AAP), compuesto relacionado con el estrés hídrico de la viña y con aromas a barniz, miel o azahar a elevada concentración en los vinos (Rapp y col., 1995; Rauhut y col., 2003). La presencia de estas moléculas en vinos proporciona notas almendradas y almizcladas que pueden llegar a virar a notas animales u orina a altas concentraciones (Gerland, 2007).

La disminución de 2-feniletanol y 3-etanolindol se debe, al igual que en los vinos de *Palomino*, a deficiencias de nitrógeno fácilmente asimilable de aminoácidos con la maceración pelicular de los mostos de *Moscatel*. Y en cuanto a los compuestos herbáceos antes señalados (1-hexanol y trans- y cis-3-hexen-1-ol), se observa un aumento muy significativo de su concentración con el tiempo de maceración, al contrario de lo que ocurría con los de *Palomino fino*. Con esto se viene a corroborar que la maceración influye de distinta manera según la variedad.

El aumento de la proporción de ésteres con la maceración en los vinos de *Moscatel* se debe principalmente al aumento en acetato de isoamilo (16000%), hexanoato de etilo (1520%) y el octanoato de etilo (136,7%), responsables de los aromas afrutados (a manzana, a plátano, a piña) de los vinos. Por otra parte se produce una disminución del decanoato (-78,1%), laurato (-73,6%) y cinamato (-60%) de etilo.

Como se observa en la Tabla 26, en los vinos de *Moscatel* el contenido total de aromas disminuye con la maceración debido fundamentalmente a la disminución de la proporción de ácidos. Sin embargo, los niveles de ésteres alcanzados con la maceración en estos vinos son mucho más altos que los obtenidos en los vinos de *Palomino*, lo que parece indicar que los mostos de uva *Moscatel* contienen más aromas libres y precursores de aromas que los mostos de uva *Palomino*.

1.6.4. Influencia sobre el valor de aroma

Hasta ahora hemos analizado la influencia de la maceración pelicular sobre los compuestos aromáticos. Sin embargo, la contribución real de cada compuesto al aroma del vino sólo se puede medir a través de los umbrales de percepción correspondientes. De ahí surge el concepto de valor de actividad de aroma VAO (“valor activity odor”) que se define como la relación entre la concentración de cada compuesto y el umbral de percepción del mismo.

En este apartado se reanaliza, a partir de los VAOs, una aproximación real del efecto de la maceración sobre el aroma del vino.

En las Tablas 27 y 28 se representan los valores VAOs correspondientes a los vinos testigos y macerados de *Palomino* y *Moscatel* respectivamente. En dichas tablas no se han incluido los compuestos aromáticos que presentaron VAOs $< 0,01$. Asimismo, los compuestos cuyos VAOs > 1 son los que contribuyen de una forma realmente significativa al aroma del vino.

De este modo, sólo el ácido octanoico y los ésteres hexanoato, octanoato y cinamato de etilo así como el 3-metil-1-butanol presentaron VAOs que excedieron a la unidad para los vinos testigo y macerados de ambas variedades, siendo el octanoato de etilo el que presenta mayores valores. Además, en los vinos de *Moscatel* mostraron VAOs >1 el ácido decanoico y el linalol.

El octanoato de etilo es uno de los ésteres que se encuentran en mayor concentración en los vinos blancos y, además presenta un umbral de percepción muy bajo ($5 \mu\text{g/L}$), lo cual contribuye a una mayor participación en el valor de aroma de los vinos aportándoles aromas afrutados con notas a piña o pera. Por otra parte, la contribución de los alcoholes superiores

se puede considerar en todos los casos como positiva, ya que presentaron valores de aroma inferiores a 9 (concentraciones inferiores a los 400 mg/L) (Gil y col., 2006).

Tabla 27. Influencia de la maceración pelicular sobre el perfil aromático de los vinos *Palomino fino*
(Valores medios \pm DS)

| | 0 | 4 | 8 | 12 | |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----|
| ACIDOS | | | | | |
| Isovalérico | 0,958 \pm 0,001 | 0,676 \pm 0,001 | 0,505 \pm 0,000 | 0,597 \pm 0,000 | L |
| Hexanoico | 0,933 \pm 0,010 | 1,027 \pm 0,026 | 0,907 \pm 0,006 | 1,008 \pm 0,034 | H |
| Octanoico | 1,944 \pm 0,061 | 1,987 \pm 0,051 | 1,934 \pm 0,008 | 1,968 \pm 0,070 | L |
| Decanoico | 0,028 \pm 0,011 | 0,128 \pm 0,007 | 0,046 \pm 0,004 | 0,154 \pm 0,002 | DO |
| TERPENOS | | | | | |
| Citronelol | 0,041 \pm 0,003 | 0,043 \pm 0,003 | 0,029 \pm 0,005 | 0,044 \pm 0,006 | F |
| ALCOHOLES | | | | | |
| 1-hexanol | 0,011 \pm 0,006 | 0,009 \pm 0,000 | 0,010 \pm 0,000 | 0,010 \pm 0,000 | H |
| cis-3-hexen-1-ol | 0,017 \pm 0,002 | 0,013 \pm 0,001 | 0,011 \pm 0,000 | 0,012 \pm 0,000 | H |
| Alcohol feniletilo | 0,146 \pm 0,003 | 0,129 \pm 0,002 | 0,094 \pm 0,004 | 0,122 \pm 0,006 | F |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | 1,783 \pm 0,012 | 3,004 \pm 0,047 | 3,179 \pm 0,051 | 4,642 \pm 0,073 | E |
| ÉSTERES | | | | | |
| Butirato de etilo | 0,026 \pm 0,004 | 0,006 \pm 0,003 | 0,025 \pm 0,002 | 0,028 \pm 0,006 | A |
| Acetato de isoamilo | 0,783 \pm 0,099 | 0,391 \pm 0,001 | 0,907 \pm 0,078 | 0,668 \pm 0,051 | A |
| Hexanoato de etilo | 3,952 \pm 0,438 | 3,892 \pm 0,116 | 7,267 \pm 0,558 | 6,249 \pm 0,512 | A |
| Octanoato de etilo | 23,578 \pm 1,546 | 31,513 \pm 0,890 | 47,722 \pm 4,610 | 51,595 \pm 5,386 | A |
| Decanoato de etilo | 0,106 \pm 0,025 | 0,136 \pm 0,012 | 0,201 \pm 0,034 | 0,184 \pm 0,037 | A |
| Succinato de dietilo | 0,042 \pm 0,003 | 0,043 \pm 0,003 | 0,037 \pm 0,004 | 0,054 \pm 0,004 | A |
| Pentanoato de etilo | 0,169 \pm 0,010 | 0,156 \pm 0,004 | 0,119 \pm 0,017 | 0,147 \pm 0,003 | A |
| Acetato de feniletilo | 0,335 \pm 0,024 | 0,335 \pm 0,029 | 0,322 \pm 0,008 | 0,277 \pm 0,026 | F |
| Cinamato de etilo | 4,800 \pm 5,980 | 11,305 \pm 6,790 | - | 4,720 \pm 2,990 | A |
| ALCOHOLES SUPERIORES | | | | | |
| 1-propanol | 0,026 \pm 0,003 | 0,059 \pm 0,002 | 0,058 \pm 0,002 | 0,062 \pm 0,003 | A |
| 2-metil-1-propanol | 0,367 \pm 0,023 | 1,067 \pm 0,036 | 0,967 \pm 0,026 | 1,033 \pm 0,015 | O |
| 2-metil-1-butanol | 0,500 \pm 0,007 | 1,433 \pm 0,012 | 1,300 \pm 0,020 | 1,433 \pm 0,018 | O |
| 3-metil-1-butanol | 2,167 \pm 0,050 | 6,100 \pm 0,108 | 5,733 \pm 0,067 | 5,867 \pm 0,024 | O |
| COMPUESTOS CARBONILO | | | | | |
| acetaldehído | 1,700 \pm 0,010 | 1,800 \pm 0,011 | 1,500 \pm 0,011 | 1,200 \pm 0,010 | O |
| acetato etilo | 0,667 \pm 0,010 | 1,583 \pm 0,083 | 1,583 \pm 0,117 | 1,500 \pm 0,083 | O |

Serie aromática: L: láctea; H: herbácea; DO: de oxidación; F: floral; E: especiada; A: afrutada; O: otros

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 28. Influencia de la maceración pelicular sobre el perfil aromático de los vinos *Moscatel de Alejandría* (Valores medios \pm DS)

| | 0 | 4 | 8 | 12 | |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----|
| ACIDOS | | | | | |
| Isovalérico | 0,193 \pm 0,008 | 0,120 \pm 0,013 | 0,222 \pm 0,003 | 0,164 \pm 0,002 | L |
| Hexanoico | 0,955 \pm 0,076 | 0,494 \pm 0,087 | 0,986 \pm 0,020 | 0,902 \pm 0,084 | H |
| Octanoico | 2,887 \pm 0,345 | 1,523 \pm 0,120 | 2,347 \pm 0,205 | 2,454 \pm 0,379 | L |
| Decanoico | 1,545 \pm 0,009 | 0,021 \pm 0,004 | 0,137 \pm 0,021 | 0,042 \pm 0,006 | DO |
| TERPENOS | | | | | |
| Linalol | 7,327 \pm 0,545 | 7,259 \pm 0,247 | 11,083 \pm 1,427 | 11,735 \pm 1,613 | F |
| α -terpineol | 0,315 \pm 0,027 | 0,254 \pm 0,063 | 0,399 \pm 0,099 | 0,406 \pm 0,094 | F |
| Citronelol | 0,508 \pm 0,030 | 0,419 \pm 0,143 | 0,723 \pm 0,369 | 0,685 \pm 0,295 | F |
| Nerol | 0,022 \pm 0,010 | 0,025 \pm 0,011 | 0,044 \pm 0,001 | 0,047 \pm 0,003 | F |
| Geraniol | 0,978 \pm 0,360 | 0,468 \pm 0,157 | 1,017 \pm 0,642 | 1,407 \pm 0,054 | F |
| Hotrienol | 0,055 \pm 0,018 | 0,030 \pm 0,037 | 0,066 \pm 0,029 | 0,065 \pm 0,012 | F |
| Trans-óxido de linalol | 0,314 \pm 0,088 | 0,315 \pm 0,030 | 0,471 \pm 0,030 | 0,491 \pm 0,095 | F |
| Cis-óxido de linalol | 1,196 \pm 0,473 | 1,072 \pm 0,298 | 1,668 \pm 0,517 | 1,685 \pm 0,240 | F |
| ALCOHOLES | | | | | |
| 1-hexanol | 0,012 \pm 0,003 | 0,021 \pm 0,001 | 0,036 \pm 0,002 | 0,032 \pm 0,004 | H |
| cis-3-hexen-1-ol | 0,002 \pm 0,002 | 0,003 \pm 0,001 | 0,006 \pm 0,002 | 0,005 \pm 0,002 | H |
| Alcohol feniletilo | 0,155 \pm 0,012 | 0,072 \pm 0,004 | 0,111 \pm 0,001 | 0,094 \pm 0,008 | F |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | - | 0,052 \pm 0,006 | 0,066 \pm 0,004 | 0,053 \pm 0,014 | E |
| ÉSTERES | | | | | |
| Butirato de etilo | - | 0,017 \pm 0,002 | 0,025 \pm 0,002 | 0,038 \pm 0,007 | A |
| Acetato de isoamilo | 0,026 \pm 0,047 | 1,588 \pm 0,317 | 2,176 \pm 0,493 | 4,210 \pm 1,045 | A |
| Hexanoato de etilo | 1,047 \pm 0,448 | 8,720 \pm 1,140 | 10,399 \pm 1,980 | 16,950 \pm 3,318 | A |
| Octanoato de etilo | 35,044 \pm 3,432 | 41,811 \pm 5,052 | 67,025 \pm 5,306 | 82,941 \pm 8,476 | A |
| Decanoato de etilo | 0,835 \pm 0,197 | 0,101 \pm 0,013 | 0,143 \pm 0,020 | 0,183 \pm 0,037 | A |
| Succinato de dietilo | 0,056 \pm 0,011 | 0,056 \pm 0,024 | 0,060 \pm 0,006 | 0,062 \pm 0,013 | A |
| Acetato de feniletilo | 1,156 \pm 0,244 | 0,592 \pm 0,107 | 0,972 \pm 0,225 | 1,020 \pm 0,249 | F |
| Laurato de etilo | 0,128 \pm 0,033 | 0,031 \pm 0,008 | 0,024 \pm 0,009 | 0,034 \pm 0,006 | H |
| Cinamato de etilo | 59,627 \pm 15,470 | 19,769 \pm 5,130 | 26,332 \pm 6,830 | 23,931 \pm 6,210 | A |
| ALCOHOLES SUPERIORES | | | | | |
| 1-propanol | 0,085 \pm 0,004 | 0,108 \pm 0,012 | 0,111 \pm 0,009 | 0,118 \pm 0,003 | A |
| 2-metil-1-propanol | 0,900 \pm 0,016 | 1,037 \pm 0,018 | 1,133 \pm 0,029 | 1,033 \pm 0,027 | O |
| 2-metil-1-butanol | 1,033 \pm 0,011 | 1,200 \pm 0,008 | 0,900 \pm 0,021 | 0,900 \pm 0,016 | O |
| 3-metil-1-butanol | 5,200 \pm 0,030 | 5,867 \pm 0,074 | 4,900 \pm 0,027 | 5,000 \pm 0,048 | O |
| COMPUESTOS CARBONILO | | | | | |
| acetaldehído | 1,700 \pm 0,080 | 1,000 \pm 0,100 | 1,710 \pm 0,090 | 1,600 \pm 0,090 | O |
| acetato etilo | 2,000 \pm 0,124 | 2,580 \pm 0,083 | 2,100 \pm 0,100 | 2,250 \pm 0,083 | O |

Serie aromática: L: láctea; H: herbácea; DO: de oxidación; F: floral; E: especiada; A: afrutada; O: otros

Los resultados recogidos en estas tablas (27 y 28) nos llevan a las siguientes consideraciones en cuanto a la influencia de la maceración sobre el perfil aromático de los vinos de *Palomino* y *Moscatel*.

En cuanto a los vinos de *Palomino*:

- a) La maceración puede aumentar ligeramente algunos defectos aromáticos derivados de los ácidos grasos (herbáceo, graso, rancio).
- b) Como cabía esperar, la maceración no tiene ningún efecto sobre el carácter floral, ni sobre los aromas típicamente herbáceos (1-hexanol).
- c) El carácter afrutado aumenta significativamente con el tiempo, destacando fundamentalmente el aporte del octanoato de etilo.
- d) El carácter especiado representado por el 2-metoxi-4-vinilfenol, se incrementa con el tiempo de maceración.
- e) El aporte de los alcoholes superiores aumenta con la maceración, principalmente debido al 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.
- f) Las maceraciones cortas conllevan a un aumento de compuestos carbonilo como el acetaldehído y acetato de etilo típicos de los aromas a almendra amarga y brandy respectivamente.

En cuanto a los vinos de *Moscatel*:

- a) Las maceraciones cortas (4 h) conllevan a una disminución de los aromas grasos y rancios producidos por los ácidos octanoico y decanoico.
- b) Son necesarias maceraciones largas para potenciar el carácter floral del aroma (linalol y geraniol).
- c) La maceración no tiene ninguna repercusión sobre los aromas herbáceos (1-hexanol y cis-hexen-1-ol).

- d) El carácter afrutado representado por acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo, aumentan linealmente con el tiempo de maceración (0,9612; 0,9600 y 0,9515 respectivamente)
- e) Las maceraciones cortas (4 h) conllevan también a un aumento de los alcoholes superiores, principalmente 2- y 3-metil-1-butanol, y acetato de etilo. Sin embargo, a maceraciones más prolongadas (8 y 12 horas) los niveles de dichos compuestos son incluso menores que los iniciales.

V.1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Una vez analizado el efecto de la maceración pelicular sobre los compuestos aromáticos, se ha visto conveniente realizar un análisis estadístico multivariante al conjunto de variables estudiadas, tanto a las fisicoquímicas como a los compuestos aromáticos principales reflejados en los VAOs para cada una de las variedades. En concreto se realizó un análisis de componentes principales (ACP), con el fin de agrupar variables, altamente correlacionadas entre sí o que exhiben un comportamiento similar con el tiempo de maceración, en unos factores que explican una alta proporción de la varianza total de los datos.

En el caso de los vinos de la variedad *Palomino fino*, el ACP aplicado a 39 variables (19 variables fisicoquímicas generales y 20 variables VAO aromáticas (Tabla 29) conduce a la extracción de dos factores que explican el 81,1% de la varianza total de los datos.

Tabla 29. Resultados del Análisis de Componentes Principales para los vinos de la variedad *Palomino* *fino* a distintos tiempos de maceración (cargas factoriales > 0,70000)

| Variable | Factor 1 | Factor 2 | Variable | Factor 1 | Factor 2 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Grado alcohólico</i> | 0,98325 | 0,14657 | <i>Cis-3-hexen-1-ol</i> | -0,96529 | -0,07876 |
| <i>Glicerina</i> | 0,83254 | -0,27598 | <i>Alcohol feniletilo</i> | -0,69898 | -0,45009 |
| <i>Acidez total</i> | -0,13921 | 0,17666 | <i>2-metoxi-4-vinilfenol</i> | 0,89638 | 0,13586 |
| <i>pH</i> | -0,91299 | 0,35028 | <i>Butirato de etilo</i> | -0,13540 | 0,93815 |
| <i>IPT</i> | 0,16028 | -0,70066 | <i>Acetato de isoamilo</i> | -0,19966 | 0,95464 |
| <i>Abs 470</i> | 0,13752 | -0,97474 | <i>Hexanoato de etilo</i> | 0,63659 | 0,74804 |
| <i>Dabs 470</i> | 0,09901 | -0,98387 | <i>Octanoato de etilo</i> | 0,86477 | 0,49212 |
| <i>Na</i> | -0,24858 | -0,85102 | <i>Decanoato de etilo</i> | 0,83631 | 0,51917 |
| <i>K</i> | 0,74790 | -0,05216 | <i>Succinato de dietilo</i> | 0,33158 | -0,08736 |
| <i>Fe</i> | 0,04608 | -0,92708 | <i>Pentanoato de etilo</i> | -0,65619 | -0,51613 |
| <i>Mg</i> | -0,75208 | -0,65093 | <i>Acetato de feniletilo</i> | -0,61388 | -0,39025 |
| <i>Ca</i> | 0,33319 | -0,94269 | <i>Cinamato de etilo</i> | -0,04049 | -0,97387 |
| <i>Cu</i> | -0,82648 | 0,21423 | <i>1-propanol</i> | 0,98927 | -0,11316 |
| <i>Zn</i> | -0,91845 | -0,37389 | <i>2-metil-1-propanol</i> | 0,96167 | -0,24936 |
| <i>Ácido isovalérico</i> | -0,93363 | -0,20037 | <i>2-metil-1-butanol</i> | 0,96985 | -0,23299 |
| <i>Ácido hexanoico</i> | 0,40575 | -0,75825 | <i>3-metil-1-butanol</i> | 0,96186 | -0,21984 |
| <i>Ácido octanoico</i> | 0,35123 | -0,86648 | <i>Acetaldehído</i> | -0,57492 | -0,62493 |
| <i>Ácido decanoico</i> | 0,71209 | -0,45662 | <i>Acetato de etilo</i> | 0,95139 | -0,16714 |
| <i>Citronelol</i> | -0,13494 | -0,59699 | | | |
| <i>1-hexanol</i> | -0,61472 | 0,66126 | Exp. Var | 18,44966 | 13,19874 |
| <i>Trans-3-hexen-1-ol</i> | -0,96674 | 0,15756 | Prp. Totl | 0,47307 | 0,33843 |

El factor 1, con un 47,3% de la varianza explicada, agrupa las variables que aumentan (con signo +) o disminuyen (con signo -) con el tiempo de maceración. Entre las que aumentan destacan el grado alcohólico, la glicerina, el potasio, los compuestos afrutados octanoato y decanoato de etilo y los alcoholes superiores. Y entre los que disminuyen destacan algunos aromas anómalos como el ácido isovalérico, compuestos herbáceos como el trans-3-hexen-1-ol y el cis-3-hexen-1-ol y otros que no son interesantes en vinos blancos como el acetaldehído.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si representamos el factor 1 frente al tiempo de maceración (Fig. 36), se puede observar una cierta correlación positiva que viene a indicar que las variables con signo positivo contribuyen de forma determinante en el factor 1, pudiéndose considerar dichas variables (sobre todo las aromáticas), como positivas para la calidad del vino.

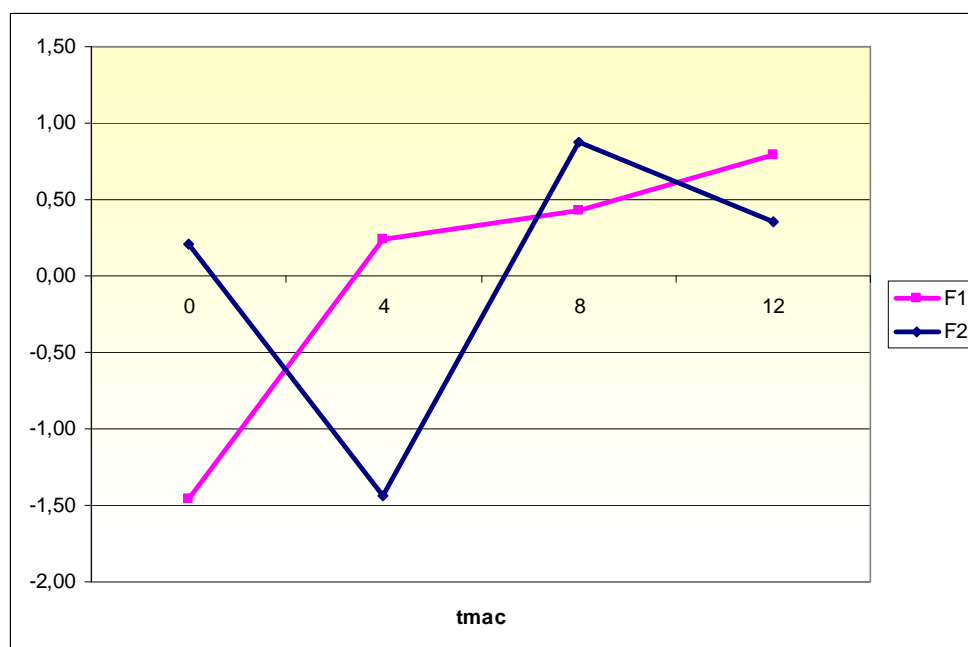


Fig. 36. Distribución de cargas factoriales con el tiempo de maceración de los vinos *Palomino fino*

Por otro lado, el factor 2 explica el 33,8% de la varianza y agrupa con signo positivo algunos ésteres y acetatos con carácter afrutado como el acetato de isoamilo y el hexanoato de etilo; y con signo negativo un mayor número de variables entre las que se destacan las relacionadas con el color y la tendencia al pardeamiento, así como algunos cationes responsables de la inestabilidad oxidativa o tartárica como el Fe o el Ca, y algunos aromas anómalos como el ácido hexanoico y heptanoico.

El factor 2 engloba a todas aquellas variables que no muestran una tendencia clara con la maceración sino que aumentan o disminuyen a lo largo de la misma. Como se puede observar en la Fig. 36, el factor 2 disminuye a las 4 horas de maceración para aumentar a las 8 horas y disminuir ligeramente a las 12 horas.

Para los vinos de *Moscatel de Alejandría* (Tabla 30) se extraen también dos factores que, en su conjunto, explican una mayor varianza que en caso anterior, el 92,5% de la varianza total de los datos. Al igual que ocurría con los vinos de *Palomino*, el factor 1 explica la mayor proporción de dicha varianza (51,6%), mientras que el factor 2 explica el 40,9%. Asimismo, el factor 1 engloba las variables que presentan un comportamiento lineal con el tiempo de maceración, agrupando las variables que aumentan (con signo +) o disminuyen (con signo -) con el mismo, entre los que destacan el grado alcohólico, la glicerina, la abs 470 nm, y la mayoría de los cationes (Fe, Ca, Cu y Zn), así como los principales terpenos: linalol y nerol. Agrupa también a los alcoholes minoritarios y a los ésteres (a excepción del acetato de feniletilo). El comportamiento del factor 1 es muy parecido al encontrado con el primer análisis, por lo que igualmente lo podemos denominar factor de carácter aromático.

Del mismo modo, el factor 2 muestra similar comportamiento que el ACP de *Palomino*, agrupando las variables que presentan oscilaciones durante el proceso de maceración. Entre las variables cabe destacar los aromas anómalos tales como el ácido octanoico y el decanoico.

Al representar los “scores” de cada factor frente al tiempo de maceración (Fig. 37) se observa que el factor 1 aumenta con el tiempo de maceración, siendo mayor la pendiente de 0 a 4 horas. El factor 2 en cambio muestra un comportamiento variable, disminuyendo bruscamente a las 4 horas para volver a aumentar y disminuir ligeramente a las 8 y 12 horas respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 30. Resultados del Análisis Componentes Principales para los vinos de la variedad *Moscatel de Alejandría* a distintos tiempos de maceración (cargas factoriales > 0,70000)

| Variable | Factor 1 | Factor 2 | Variable | Factor 1 | Factor 2 |
|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Grado alcohólico</i> | 0,94646 | 0,12351 | <i>Geraniol</i> | 0,35837 | 0,78843 |
| <i>Glicerina</i> | -0,94100 | 0,15013 | <i>1-hexanol</i> | 0,92326 | 0,29297 |
| <i>Acidez total</i> | 0,56612 | -0,80996 | <i>Cis-3-hexen-1-ol</i> | 0,92304 | 0,30831 |
| <i>pH</i> | 0,09474 | 0,99375 | <i>Alcohol feniletilo</i> | -0,71483 | 0,69866 |
| <i>IPT</i> | -0,19312 | -0,37221 | <i>2-metoxi-4-vinilfenol</i> | 0,91574 | -0,16361 |
| <i>Abs 470</i> | -0,84962 | -0,26811 | <i>Butirato de etilo</i> | 0,97719 | 0,07646 |
| <i>Dabs 470</i> | 0,48864 | -0,83151 | <i>Acetato de isoamilo</i> | 0,93019 | 0,09130 |
| <i>Na</i> | 0,24088 | 0,85714 | <i>Hexanoato de etilo</i> | 0,96505 | 0,00350 |
| <i>K</i> | 0,61204 | -0,78366 | <i>Octanoato de etilo</i> | 0,88643 | 0,40559 |
| <i>Fe</i> | -0,94775 | 0,28857 | <i>Decanoato de etilo</i> | -0,88691 | 0,38232 |
| <i>Mg</i> | -0,26266 | -0,93357 | <i>Succinato de dietilo</i> | 0,78954 | 0,56707 |
| <i>Ca</i> | 0,97582 | -0,21657 | <i>Acetato de feniletilo</i> | -0,28546 | 0,91472 |
| <i>Cu</i> | -0,92712 | 0,31328 | <i>Laurato de etilo</i> | -0,91841 | 0,27562 |
| <i>Zn</i> | -0,99076 | -0,09290 | <i>Cinamato de etilo</i> | -0,87881 | 0,44732 |
| <i>Ácido isovalérico</i> | -0,03555 | 0,99913 | <i>1-propanol</i> | 0,99171 | -0,12829 |
| <i>Ácido hexanoico</i> | -0,91850 | 0,36209 | <i>2-metil-1-propanol</i> | 0,30236 | -0,92481 |
| <i>Ácido octanoico</i> | -0,37577 | 0,87996 | <i>2-metil-1-butanol</i> | -0,44494 | -0,89211 |
| <i>Ácido decanoico</i> | -0,07650 | 0,91421 | <i>3-metil-1-butanol</i> | -0,20072 | -0,97736 |
| <i>Linalool</i> | 0,81805 | 0,57001 | <i>Acetaldehído</i> | -0,07830 | 0,99525 |
| <i>a-terpineol</i> | 0,57823 | 0,81179 | <i>Acetato de etilo</i> | 0,26029 | -0,94956 |
| <i>Citronelol</i> | 0,62121 | 0,77944 | Exp. Var | 21,65804 | 17,20186 |
| <i>Nerol</i> | 0,87226 | 0,48867 | Prp. Totl | 0,51567 | 0,40957 |

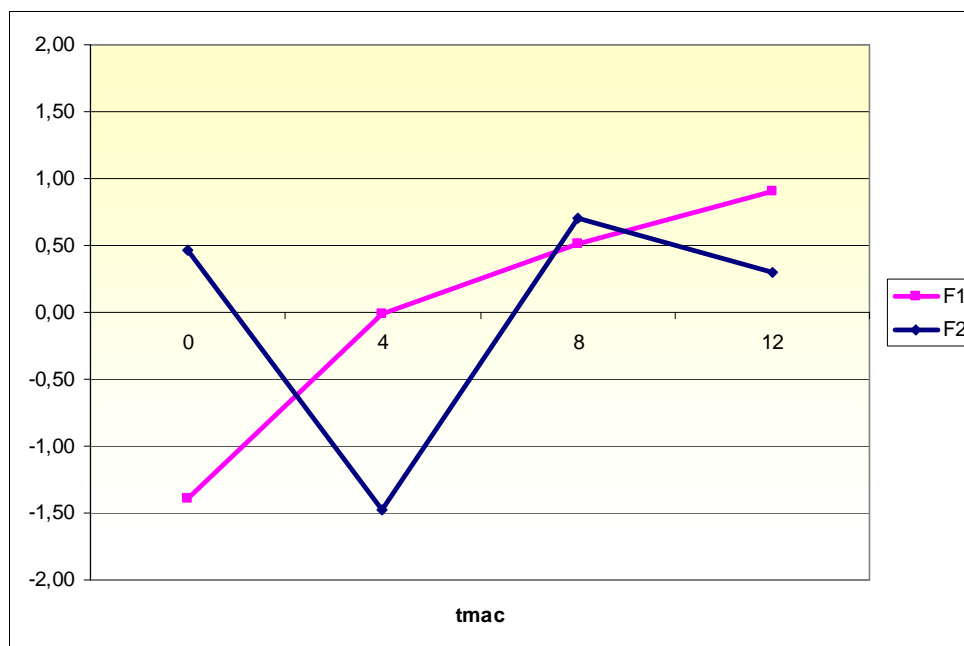


Fig. 37. Distribución de cargas factoriales con el tiempo de maceración de los vinos *Moscatel de Alejandría*

Analizando con más detalle la contribución de las distintas variables a los dos factores se puede observar que, para ambas variedades, las variables que contribuyen positivamente al factor 1 contribuyen también a la calidad del vino, sobre todo desde el punto de vista aromático, con lo cual un aumento de dicho factor con el tiempo de maceración nos indica un aumento de la calidad. Por otra parte, la disminución del factor 2 a las 4 horas de maceración es indicativa de un aumento de la acidez total y del color y tendencia al pardeamiento (carga negativa) así como de una disminución de ésteres e incluso terpenos (carga positiva) en el caso de los vinos de *Moscatel*, fenómenos que contribuyen negativamente a la calidad del vino y que se vuelven a repetir levemente a las 12 horas de maceración.

Atendiendo a estos resultados, por combinación de ambos factores se puede determinar un factor de calidad de maceración para ambas variedades indicativo del tiempo óptimo de maceración en cada caso. Así, si representamos la suma de “scores” ($F1 + F2$) para

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cada una de las variedades (Fig. 38) obtenemos un factor de calidad que engloba a todas las variables analizadas y nos muestra una evolución global de las mismas con la maceración.

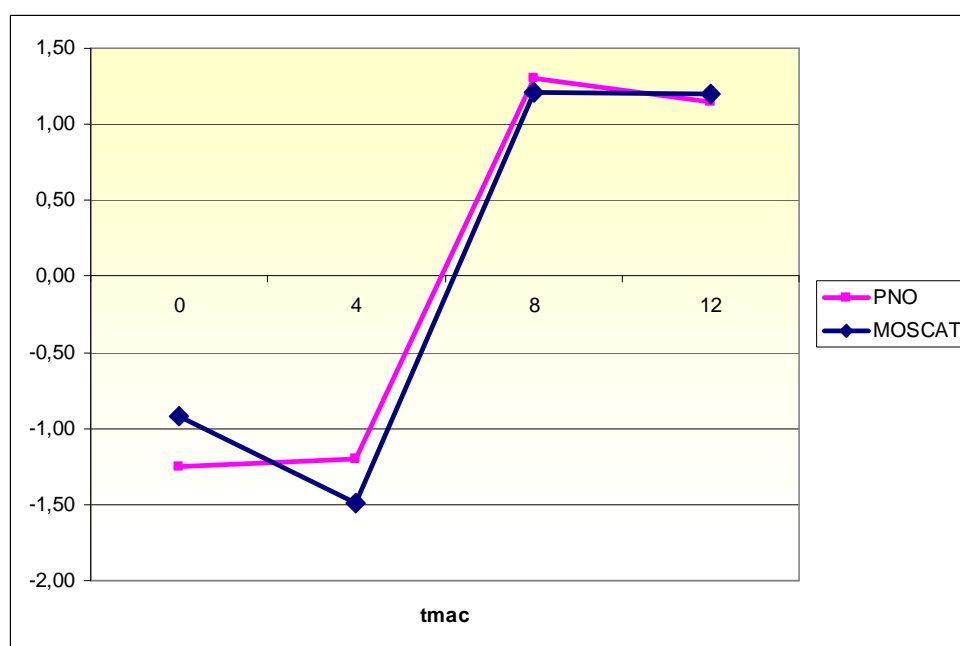


Fig. 38. Distribución del factor de calidad (F1+F2) con el tiempo de maceración para ambos tipos de vino

Como se puede observar en la Fig. 38, el factor de calidad de los vinos de cada variedad presentan la misma tendencia y nos muestra que las maceraciones cortas (4 horas), como ya se observaba en otros estudios (Dubordieu y col., 1986; Cheynier y col, 1989; Sapis, 1995), no son adecuadas para ninguna de las variedades por los efectos negativos que presentan sobre los vinos (extracción de polifenoles, aumento de aromas herbáceos y a rancio, disminución de aromas afrutados, etc). El tiempo óptimo de maceración se establece entre las 8 y 12 horas para ambas variedades.

V.1.8. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO

El análisis del perfil aromático de los vinos realizado a partir de los valores de aroma (VAO), es una aproximación a las características organolépticas de los mismos, sin embargo, la cata continua siendo hasta el momento una herramienta indispensable y mucho más completa para evaluar la calidad de un vino, puesto que a través de ella se analiza no sólo el aroma, sino también otros aspectos fundamentales como el visual, gustativo y táctil. Cacho (2003) la define como el único test universal fiable para establecer las características sensoriales del vino.

En las Fig. 39-41 se recogen los resultados medios de las catas realizadas por el comité correspondiente. En concreto se analizaron los siguientes atributos: intensidad de color, intensidad y calidad de aroma, suavidad, acidez, calidez, amargor y persistencia. Como se puede observar en dichas gráficas, los vinos de *Palomino* y *Moscatel* tanto testigos como macerados mostraron, como cabía esperar, claras diferencias sensoriales entre ellos y, además, no mostraron un comportamiento uniforme con la maceración.

Los vinos testigos de ambas variedades (Fig. 39) mostraron diferencias significativas entre los distintos caracteres analizados. Los vinos de *Moscatel* destacaron por su mayor intensidad y calidad de aroma, aunque también fueron los que mostraron más acidez y sobre todo amargor. Como cabía esperar, los vinos de *Palomino* resultaron más neutros de aroma, tanto en intensidad como en calidad, mostrando ligeramente más suavidad y calidez en boca, mientras que los de *Moscatel* se valoraron como muy correctos para dicha variedad destacando algunas notas florales, a frutos secos y a tostado.

Los resultados de intensidad y calidad de aroma obtenidos en las catas para los vinos testigos de ambas variedades confirman los resultados obtenidos del perfil aromático de los vinos a partir de sus VAOs.

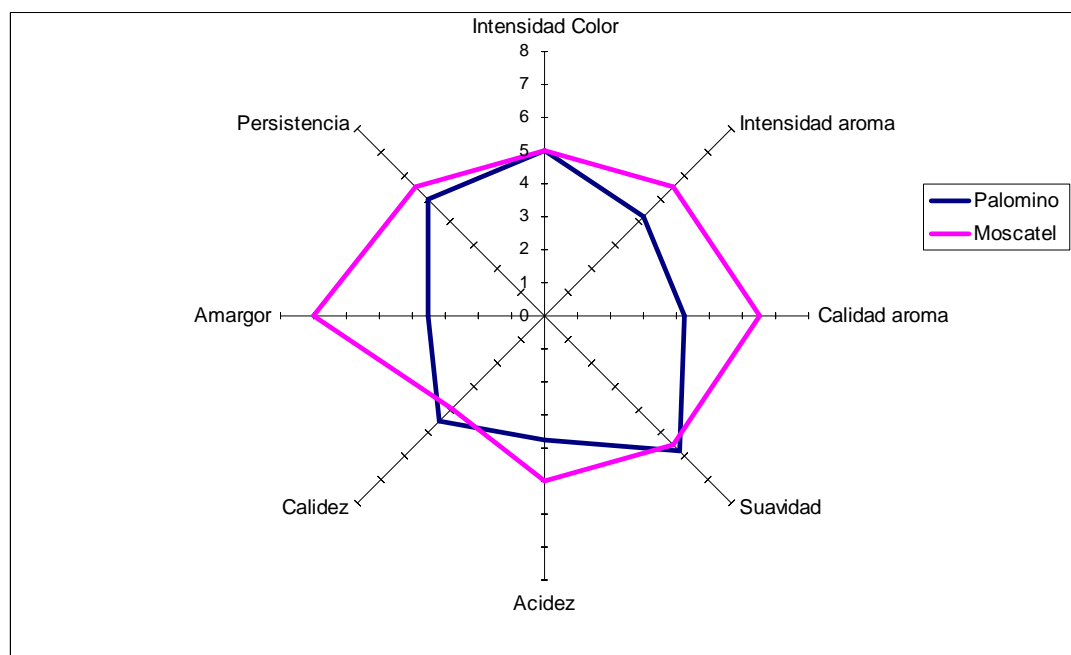


Fig. 39. Análisis sensorial de los vinos testigo *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

En cuanto a los vinos macerados, los de la variedad *Palomino* (Fig. 40), fueron puntuados con mayores valores de intensidad de color, intensidad y calidad de aroma, suavidad, calidez, amargor y menor persistencia que los testigos. Sin embargo, en ningún caso hubo una relación directa entre dicha puntuación y el tiempo de maceración. Los valores “*p*” mostrados en la figura indican si la diferencia que presenta cada variable analizada, a los distintos tiempos de maceración, con respecto al testigo es muy significativa ($p < 0,001$), significativa ($p < 0,01$), poco significativa ($p < 0,05$) o no significativa ($p > 0,05$). Así, se puede observar un aumento de la intensidad de color y amargor muy significativo para los tres tiempos de maceración, los cuales pueden deberse al aumento de polifenoles que tiene lugar durante dicho proceso. Por otra parte, también es significativo el aumento de calidez y suavidad directamente relacionado con el aumento del grado alcohólico en los vinos macerados. La intensidad y calidad de aroma aumentan también de manera significativa, siendo dicho aumento más importante a las 8 horas de maceración.

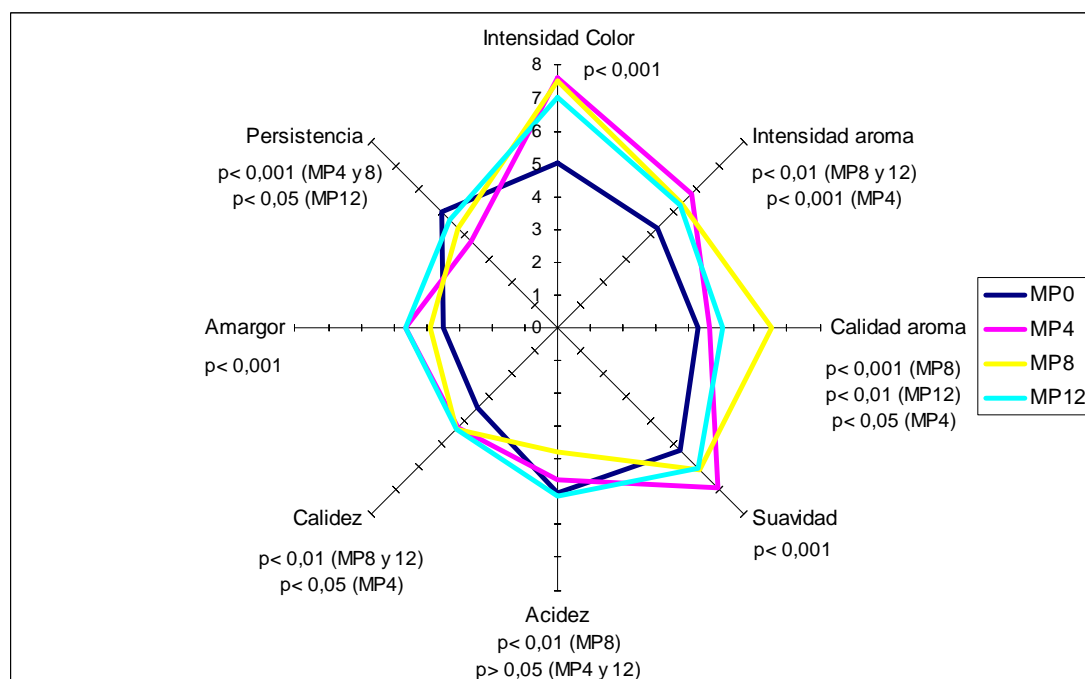


Fig. 40. Análisis sensorial de los vinos *Palomino fino* a distinto tiempo de maceración (Testigo, 4, 8 y 12 horas: MP0, MP4, MP8 y MP12 respectivamente)

En cuanto a la acidez, el resultado es menos significativo, sobre todo a las 4 y 12 horas de maceración. Aunque la aplicación de dicha técnica conlleva a una disminución de la acidez en los mostos, hay que recordar que se realizó una corrección de los mismos antes de la fermentación, de ahí que los resultados obtenidos sean muy variables y no estén directamente relacionados con el tiempo de maceración.

Atendiendo a los resultados obtenidos tanto en la cata como en los análisis finales, éstos indicaron mayor preferencia por los vinos de *Palomino* macerados 8 y 12 horas frente a los testigos. Esto concuerda con los resultados del análisis estadístico.

Los vinos macerados de *Moscatel* (Fig. 41), al igual que ocurría con los vinos macerados de *Palomino*, no mostraron una tendencia clara con la maceración, observándose además diferencias menos significativas con respecto al testigo en la mayoría de los casos. Como cabía

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

esperar, dado el aumento del grado alcohólico con la maceración, los vinos macerados mostraron un aumento significativo de la calidez y suavidad. Asimismo, fueron más ácidos y más persistentes (a excepción de MP12), aunque lo más relevante fue la disminución de intensidad de color, ya observada en los parámetros CIELAB, y del amargor característico de esta variedad.

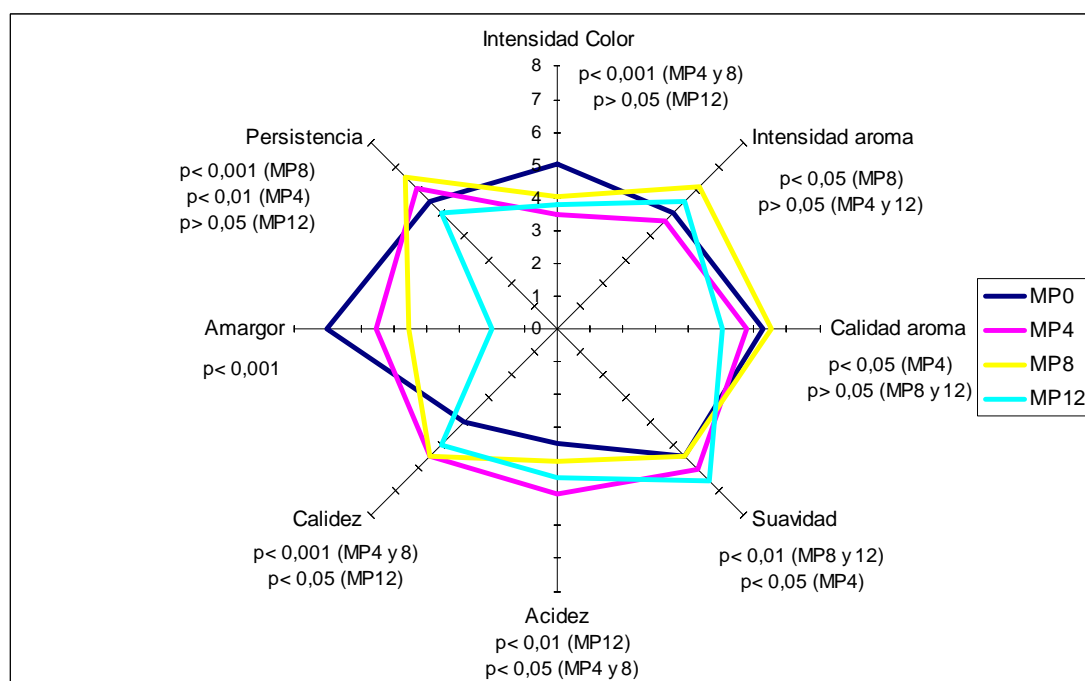


Fig. 41. Análisis sensorial de los vinos *Moscatel de Alejandria* a distinto tiempo de maceración (Testigo, 4, 8 y 12 horas: MP0, MP4, MP8 y MP12 respectivamente)

En cuanto a la intensidad y calidad de aroma, aunque en los resultados analíticos se observaban claras diferencias en el contenido de aromas a los distintos tiempos de maceración con respecto al testigo, los resultados de cata no mostraron diferencias significativas, siendo el macerado durante 8 h el que presentó valores más altos en ambos casos y el que destacó por sus aromas amoscotelados y algunas notas a regaliz. Probablemente, al tratarse de una variedad muy aromática habría que realizar las pruebas a escala industrial para detectar claras diferencias no sólo en los resultados analíticos sino también en las catas.

Realizando un análisis comparativo de los resultados de catas obtenidos para los vinos de ambas variedades se puede concluir que, aunque ambos tipos de vino, como se observaba en el análisis estadístico, muestren una misma evolución del factor de calidad durante la maceración, las variables que intervienen en dicho factor y sus correspondientes cargas van a depender de las características propias de la variedad y, entre otras, de su perfil aromático. Luego dicho perfil va a determinar también las características aromáticas del vino y, por tanto, los resultados de cata, de ahí las diferencias observadas en cada caso.

Según estos resultados, la maceración pelicular a tiempos prolongados (8 y 12 horas) es una técnica que mejora considerablemente la calidad de los vinos de *Palomino*, sobre todo desde el punto de vista sensorial. Sin embargo, en los vinos de *Moscatel* dicha mejora no es tan evidente, observándose pocas diferencias a los tiempos de maceración y condiciones estudiadas.

V.2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE SUPRAEXTRACCIÓN SOBRE LA ELABORACIÓN DE VINOS *Palomino fino* Y *Moscatel de Alejandría*

V.2.1. INFLUENCIA SOBRE EL TEJIDO CELULAR DEL GRANO

El proceso de congelación va a inducir a una serie de cambios irreversibles en los tejidos a los que se les conoce como daños por congelación y que se manifiestan tras la descongelación del tejido. Estos cambios son consecuencia de muchos procesos separados entre los cuales se destacan en los tejidos vegetales: daños por enfriamiento, daños por concentración de soluto, por la formación de cristales de hielo y por variaciones en el volumen.

Para comprobar el daño producido por la congelación-descongelación de la uva a nivel celular y, sobre todo a nivel del hollejo, se realizaron fotografías a microscopía electrónica de

barrido del hollejo de granos de uva sin congelar y después de la congelación-descongelación. Aunque el efecto de la supraextracción debe ser el mismo tanto en la cara externa del hollejo como en la interna, se decidió observar la estructura celular de ambas caras, puesto que la cara interna sería la más próxima a la pulpa y la cara externa estaría recubierta por una capa de pruina que podría actuar como barrera frente a los daños por congelación.

Las Fig. 42 y 43 muestran el efecto producido por la supraextracción en la cara externa e interna del hollejo respectivamente. Como se puede observar, en las condiciones de congelación utilizadas en nuestros ensayos (en cámara congeladora, a velocidad de congelación lenta), tanto la cara externa como la interna del hollejo parecen sufrir cambios en su textura y estructura celular.

En el primer caso (Fig. 42), de manera similar a lo que ocurre con el tratamiento de Flash-expansión (Razungles y col., 2000) con la supraextracción la superficie uniformemente lisa y regular del hollejo (A1, 500 μm) se transforma en una red de grietas y rugosidades (B1) que, observadas a mayor aumento (A3, 20 μm), convierten la superficie del tejido en un conjunto de pequeñas microestructuras entre las cuales aparecen cavidades o huecos de gran profundidad (B3).

Este mismo efecto se observa de manera más importante en el interior del hollejo (Fig. 43), donde a 500 μm (C1 y D1) el tejido aparece estructurado por una serie de líneas o cortes más o menos homogéneos. Desaparece la visión tridimensional del interior del hollejo y, en su lugar, se observa una capa plana llena de huecos o cavidades. A mayor aumento (C2-3 y D2-3) se observan con mayor resolución las características no sólo de los huecos sino también de los desgarros y cortes que se producen en el tejido. Según Mallet (1994) y, tal y como se observa en la Fig. 43, los daños causados por el mecanismo de rueda dentada del hielo se pueden observar como grandes cavidades en los tejidos descongelados, que han sido ocupados por el hielo.

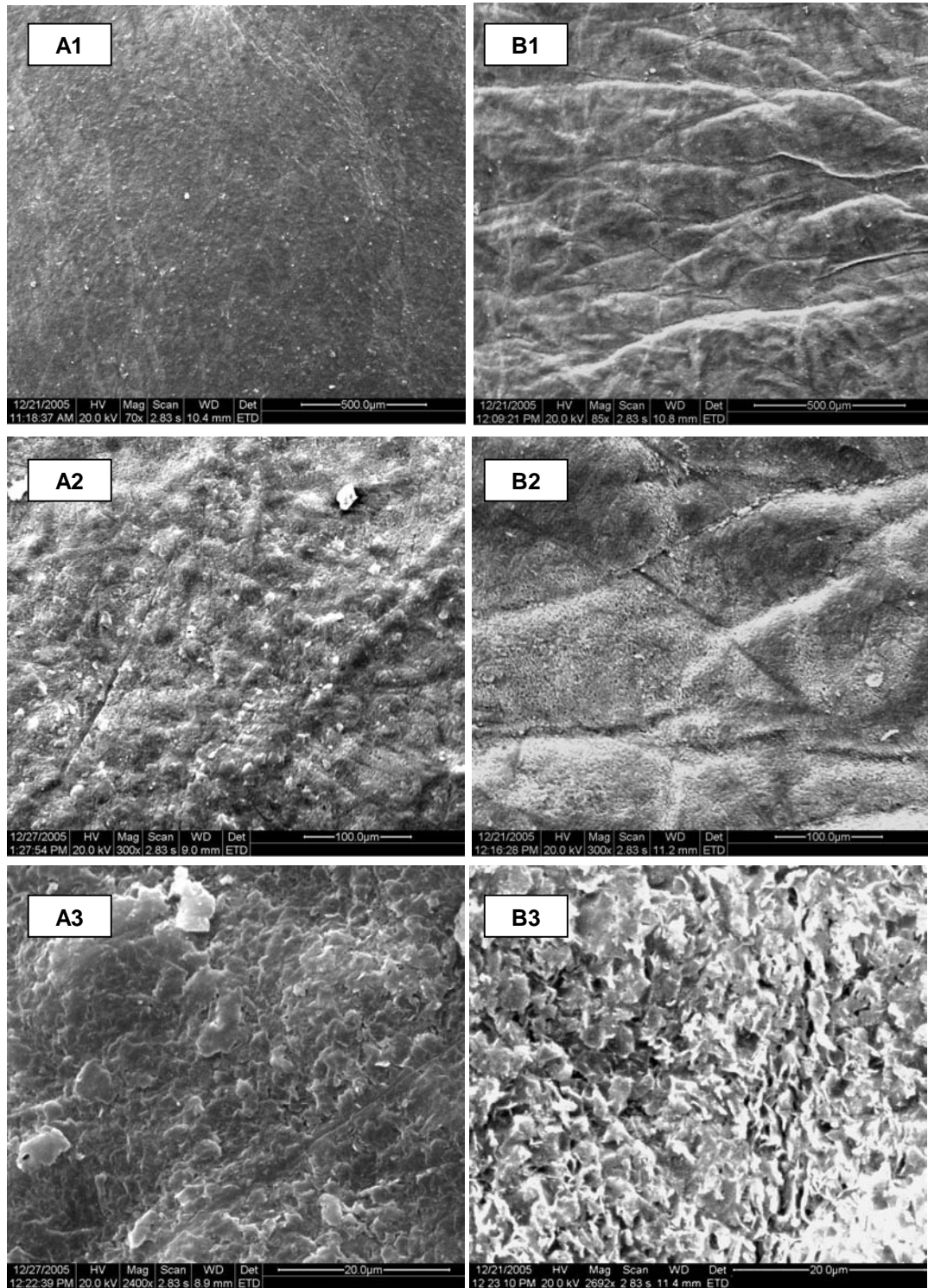


Fig. 42. Fotografías a microscopía electrónica de barrido de la cara externa del hollejo antes (izquierda) y después (derecha) de la supraextracción

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

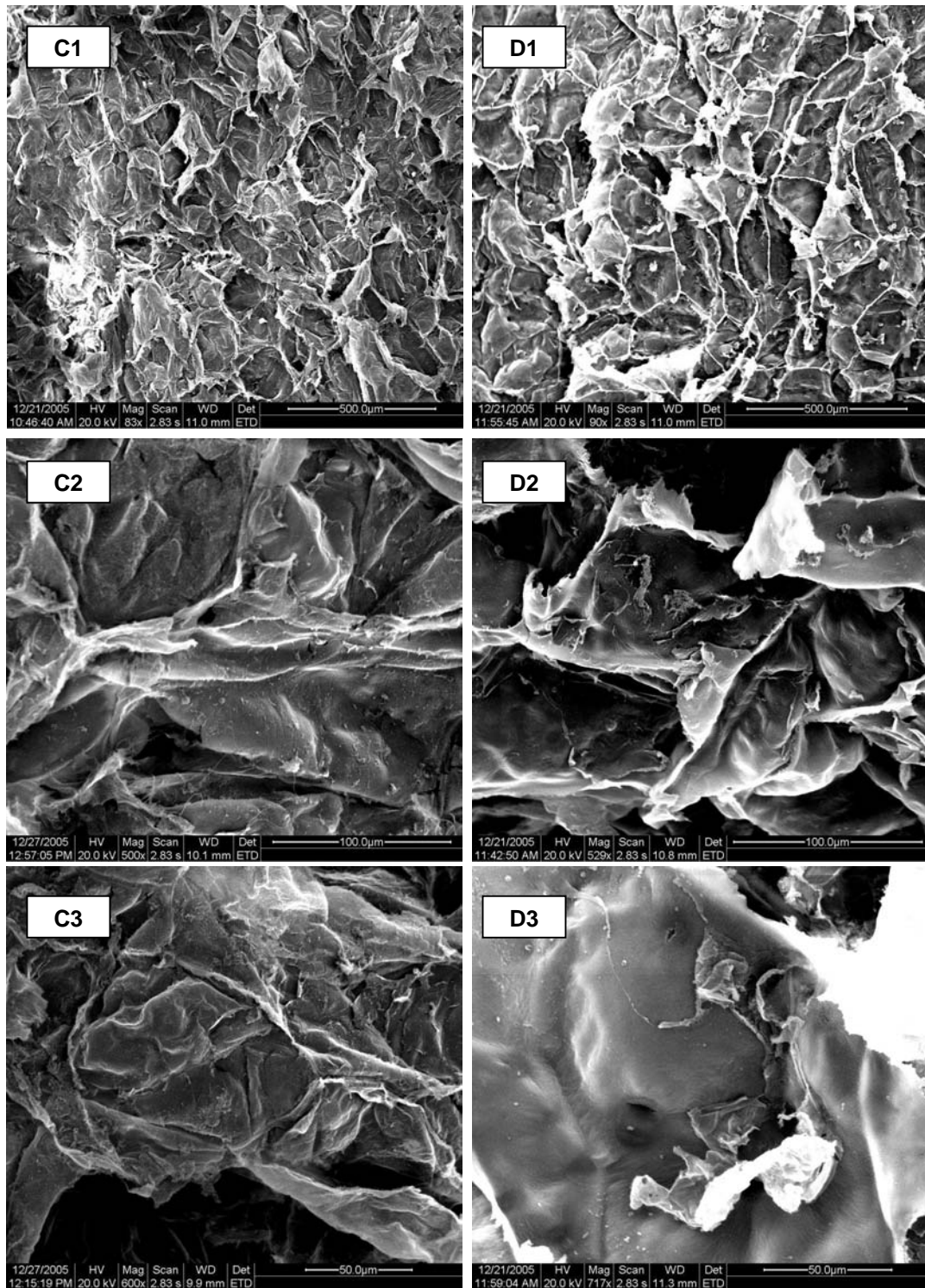


Fig. 43. Fotografías a microscopía electrónica de barrido de la cara interna del hollejo antes (izquierda) y después (derecha) de la supraextracción

Luego es evidente que la técnica de supraextracción conlleva a cambios importantes en la estructura de las membranas produciendo daños y lesiones que no sólo conducen a la deshidratación de las células sino que también provocan desgarros y cortes.

V.2.2. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MOSTO

En la Tabla 31, se recogen las características principales de los mostos utilizados como testigo y los obtenidos después del prensado de la uva congelada-descongelada de ambas variedades. Como se puede observar en dicha tabla, el principal efecto de la supraextracción es una disminución del rendimiento para ambas variedades, siendo para la variedad *Palomino fino* menos significativa. Este fenómeno se debe a que, en las condiciones de congelación (lenta) y descongelación utilizadas en nuestros ensayos (temperatura ambiente) se producen pérdidas de agua por exudado y evaporación, tanto mayor cuanto mayor es el grado de rotura y la liberación del mosto. Estas pérdidas son más pronunciadas en la variedad *Moscatel*, lo que seguramente está relacionado con el grado de rotura durante el proceso y el grosor del hollejo. Asimismo, dicha deshidratación conduce a una concentración de solutos, lo cual se ve reflejado en una mayor densidad (°Bé) en el caso de los mostos procedentes de supraextracción.

Por otra parte, la supraextracción condujo a una disminución de la acidez con el consecuente aumento del pH más acusado en el caso de los mostos de *Moscatel* (0,26 unidades). Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores en cuanto a acidez y pH (Joseph, 1992; Delteil y col., 2000) cuyo origen, a pesar del aumento de ácido málico (0,005 y 0,904 mg/L para *Palomino* y *Moscatel* respectivamente), se debe a una salificación parcial de ácidos orgánicos, principalmente ácido tartárico, debido a la extracción de sales (K, Ca).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 31. Análisis general de los mostos control y obtenidos por supraextracción a partir de las variedades *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*. (Media \pm DS)

| | <i>Palomino fino</i> | | <i>Moscatel de Alejandría</i> | |
|--|----------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | TG | SUPRA | TG | SUPRA |
| Rendimiento (L/Kg) | 0,53 \pm 0,01 | 0,50 \pm 0,01 | 0,63 \pm 0,01 | 0,40 \pm 0,01 |
| Bé | 11,8 \pm 0,0 | 12,1 \pm 0,2 | 13,0 \pm 0,1 | 13,2 \pm 0,1 |
| pH | 3,86 \pm 0,01 | 3,93 \pm 0,02 | 3,71 \pm 0,01 | 3,97 \pm 0,01 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 3,07 \pm 0,07 | 2,01 \pm 0,05 | 5,30 \pm 0,10 | 3,40 \pm 0,09 |
| IPT | 12,08 \pm 0,03 | 6,75 \pm 0,21 | 8,19 \pm 0,17 | 7,03 \pm 0,05 |
| ABS 470 | 0,110 \pm 0,001 | 0,235 \pm 0,004 | 0,175 \pm 0,001 | 0,174 \pm 0,001 |
| Ácido málico (g/L) | 0,835 \pm 0,090 | 0,840 \pm 0,040 | 1,130 \pm 0,013 | 2,034 \pm 0,0 |
| Ácido glucónico (g/L) | 0,175 \pm 0,022 | 0,032 \pm 0,010 | 0,545 \pm 0,122 | 0,038 \pm 0,008 |
| N. asimilable (mg/L) | 234,8 \pm 4,5 | 173,6 \pm 5,7 | 505,6 \pm 5,1 | 319,2 \pm 3,4 |
| Na (mg/L) | 34,0 \pm 0,2 | 32,5 \pm 0,4 | 31,0 \pm 0,3 | 30,0 \pm 0,2 |
| K (mg/L) | 1092 \pm 1 | 1075 \pm 7 | 1070 \pm 3 | 1175 \pm 4 |
| Fe (mg/L) | 0,100 \pm 0,001 | 0,200 \pm 0,006 | 0,100 \pm 0,010 | 0,200 \pm 0,003 |
| Mg (mg/L) | 57,5 \pm 0,6 | 50,0 \pm 0,3 | 62,5 \pm 0,4 | 50,0 \pm 0,2 |
| Ca (mg/L) | 135,0 \pm 0,5 | 90,0 \pm 2,0 | 130,0 \pm 1,0 | 115,0 \pm 1,0 |
| Cu (mg/L) | 1,00 \pm 0,01 | 2,50 \pm 0,02 | 1,41 \pm 0,02 | 2,10 \pm 0,01 |
| Zn (mg/L) | 0,40 \pm 0,02 | 1,10 \pm 0,05 | 0,91 \pm 0,01 | 1,10 \pm 0,02 |

Aunque algunos autores señalan que la supraextracción produce un aumento de la extracción de polifenoles (Delteil y col., 2000; Simonato y col., 2005), nuestros resultados muestran todo lo contrario, una disminución del índice de polifenoles con la supraextracción. Sin embargo, la ABS a 470 nm aumenta en los mostos de la variedad *Palomino fino*, por lo que la supraextracción parece favorecer la oxidación de compuestos polifenólicos. Esto puede deberse a la mayor carga enzimática polifenoloxidasas (PPO), descompartmentada por el efecto de rotura celular o vacuolar, y/o a la mayor tendencia a la oxidación de los compuestos fenólicos extraídos durante el proceso.

También, al igual que ocurría con la maceración pelicular, la supraextracción conlleva a una disminución de la cantidad de nitrógeno asimilable, aunque los niveles nunca caen por debajo de los 150 mg/L necesarios para una fermentación óptima (Hidalgo, 2003), siendo siempre los de *Moscatel* muy superiores a los de los mostos de *Palomino*.

Por el contrario de lo que ocurría con la maceración pelicular, el contenido en ácido glucónico disminuye significativamente con la supraextracción hasta niveles prácticamente de cero para ambas variedades. No existen referencias o estudios previos que justifiquen este fenómeno en supraextracción, por lo que actualmente estamos investigando dicho fenómeno.

En cuanto al contenido de sales, la rotura de los tejidos que se produce durante la congelación-descongelación favorece la extracción de Fe, Cu y Zn.

V.2.3. INFLUENCIA SOBRE EL DESFANGADO

Como se puede observar en la Fig. 44, la supraextracción conlleva a un aumento del número de partículas para ambas variedades (72,35% en los mostos de uva *Palomino* y del 33,89% en los mostos de *Moscatel*) antes del desfangado, debido a los desgarros y roturas producidos en el tejido vegetal y determinado por las características del hollejo. En el caso de la variedad *Palomino* los hollejos son más finos y frágiles que en el caso de la variedad *Moscatel*, de hollejo más grueso y resistente (García de Luján y col., 1990). Asimismo, el número de partículas tras el desfangado (SUPRA) es también superior al de los mostos testigo (TG), pero reduciéndose las diferencias, lo que indica que el desfangado o decantación estática de las partículas no está impedida o limitada en ninguno de los casos.

Atendiendo a la turbidez (Tabla 32), la supraextracción conlleva un aumento de la turbidez de los mostos tanto antes como después del desfangado (excepto para los de *Moscatel*), lo que parece estar directamente relacionado con el número de partículas totales que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presentan los mostos. Atendiendo a la distribución de estas partículas por tamaño (Tabla 32), se puede observar que en los mostos, la supraextracción disminuye la proporción de partículas inferiores a 5 μm para *Palomino* e inferiores a 10 μm para *Moscatel*, aumentando las de tamaño superior, sobre todo las de tamaño comprendido entre 10-20 μm .

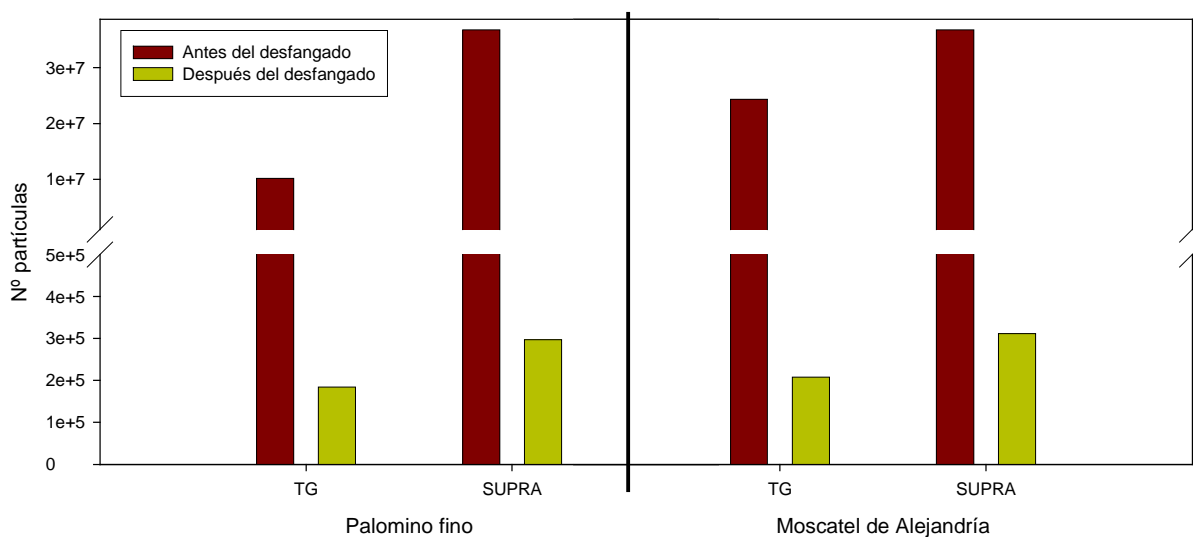


Fig. 44. Influencia de la supraextracción sobre el número de partículas totales en mostos de uva *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* antes y después del desfangado

Tabla 32. Distribución de partículas (%) antes (A) y después (D) del desfangado de los mostos de uva *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

| | | | Tamaño de partícula (μm) | | | | | Turbidez (NTU) | Disminución turbidez (%) |
|-------------------------------|-------|---|---------------------------------------|-------|-------|-------|------|----------------|--------------------------|
| | | | 2-5 | 5-10 | 10-20 | 20-40 | > 40 | | |
| <i>Palomino fino</i> | TG | A | 74,02 | 22,61 | 3,13 | 0,21 | 0,03 | 976 \pm 3 | - |
| | | D | 56,16 | 35,85 | 6,40 | 1,11 | 0,47 | 56,5 \pm 0,3 | 94,21 |
| | SUPRA | A | 43,64 | 37,16 | 17,33 | 1,68 | 0,20 | 2306 \pm 8 | - |
| | | D | 16,05 | 31,86 | 44,24 | 7,22 | 0,63 | 338 \pm 0,5 | 85,34 |
| <i>Moscatel de Alejandría</i> | TG | A | 42,17 | 40,71 | 15,81 | 1,18 | 0,13 | 1730 \pm 3 | - |
| | | D | 11,77 | 28,45 | 54,10 | 5,24 | 0,37 | 230,2 \pm 10 | 86,7 |
| | SUPRA | A | 35,38 | 35,95 | 25,36 | 3,07 | 0,23 | 2078 \pm 7 | - |
| | | D | 25,36 | 33,29 | 35,14 | 5,78 | 0,42 | 56,4 \pm 1 | 97,2 |

A pesar del aumento de turbidez y el número de partículas con la supraextracción, el desfangado se desarrolla adecuadamente obteniéndose buenos rendimientos para los mostos de ambas variedades. En los mostos de la variedad *Palomino*, el rendimiento obtenido tras el desfangado es prácticamente del mismo orden que en los mostos testigos, con la única diferencia de que la proporción de fangos gruesos es mayor que la de fangos finos. De ahí que la turbidez de los mostos sea mayor que en los testigos tanto antes como después del desfangado. En los de *Moscatel*, sin embargo, se observa una mayor compactación de los fangos tras el desfangado, aumentando el rendimiento del mosto, lo cual se ve acompañado de una menor turbidez de los mostos tras dicha operación (Tabla 32) y supone una gran ventaja enológica.

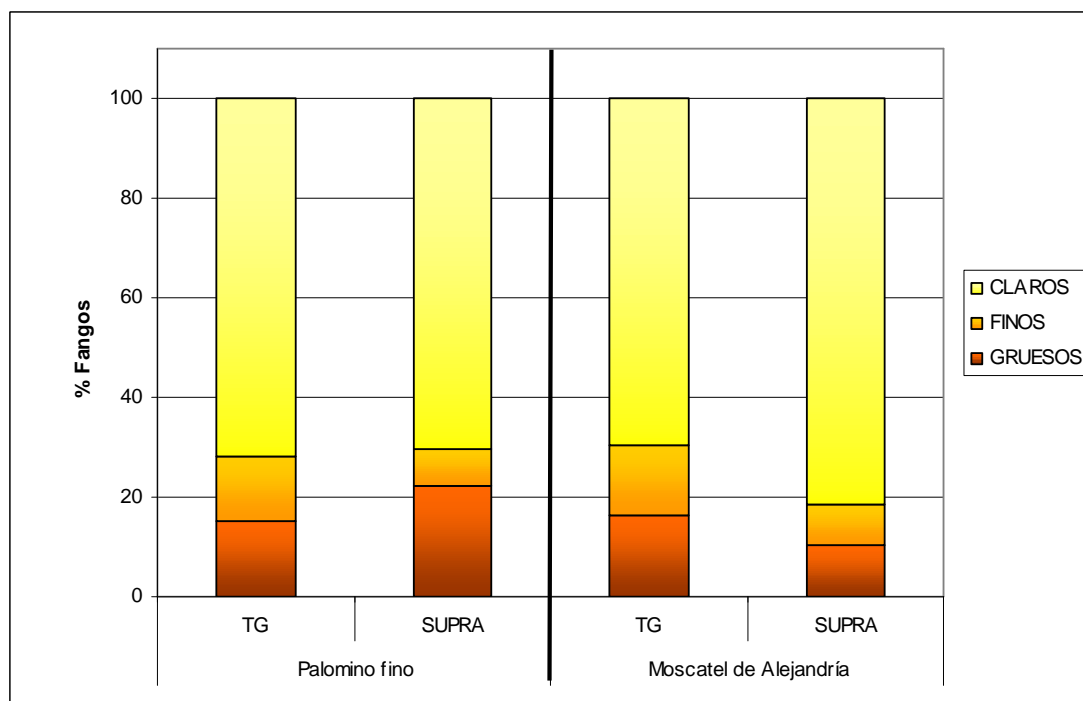


Fig. 45. Influencia de la supraextracción sobre la eficacia del desfangado en mostos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

V.2.4. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El tratamiento realizado a los mostos tras el desfogado durante 24 horas fue el mismo que el realizado en los ensayos de maceración pelicular. Asimismo se empleó la misma cepa de levadura para llevar a cabo las fermentaciones y se analizaron los mismos parámetros de control (densidad y biomasa) durante el desarrollo de la misma.

Como se puede observar en las figuras 46 y 47 y en la Tabla 33, el desarrollo de la fermentación alcohólica en los mostos de supraextracción depende claramente de las características de los mismos tras el desfogado ya que, mientras que en los mostos de *Palomino* dicho proceso produce una mejora fermentativa con respecto al testigo, en los mostos de *Moscatel* tiene lugar el fenómeno contrario. Así, la Figura 46 muestra cómo la fermentación alcohólica se desarrolla más rápidamente en los mostos de supraextracción obteniéndose además un mayor rendimiento alcohólico. En *Moscatel* (Fig. 47), sin embargo, los mostos de supraextracción presentan una velocidad de fermentación ligeramente más baja y, además, el rendimiento obtenido es del mismo orden que en los mostos testigo.

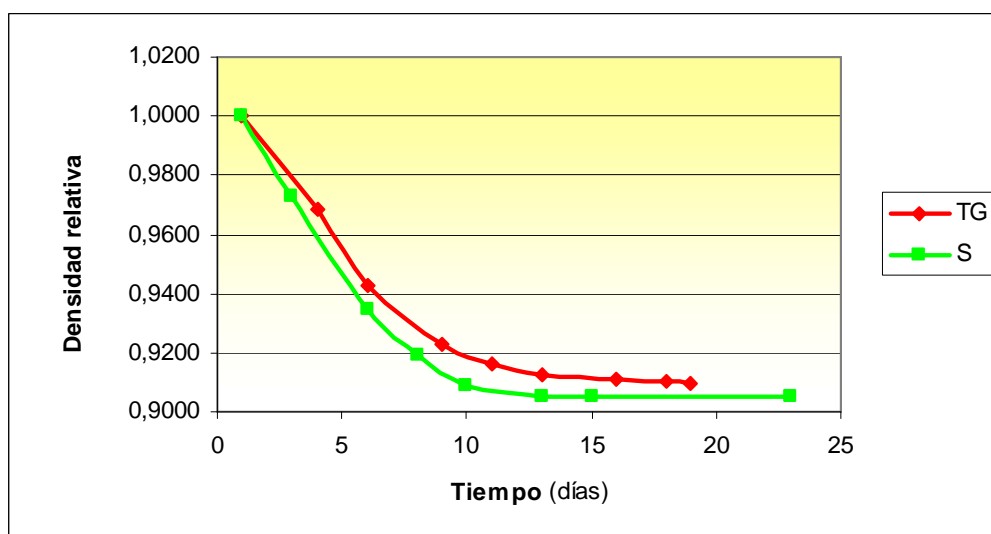


Fig. 46. Influencia de la supraextracción sobre la cinética fermentativa de mostos de uva *Palomino fino*

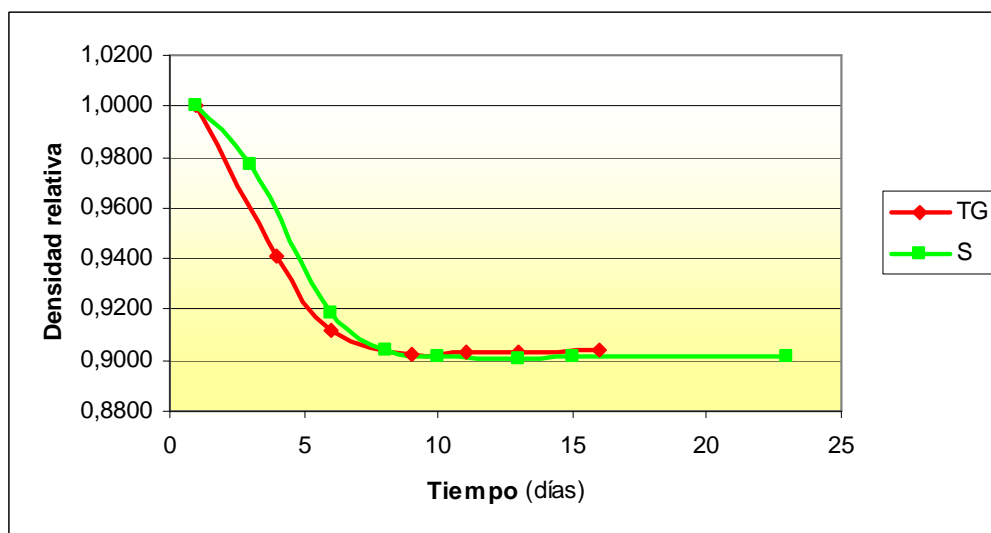


Fig. 47. Influencia de la supraextracción sobre la cinética fermentativa de mostos de uva *Moscatel de Alejandría*

Entre los factores que determinan el desarrollo de la fermentación, el contenido en nitrógeno asimilable y su riqueza en nutrientes y/o activadores de la fermentación, directamente relacionados con la turbidez del mosto, parecen tener una clara influencia sobre el proceso. Para ambas variedades, el contenido en nitrógeno fácilmente asimilable se encuentra por encima del límite establecido para una fermentación completa (< 150 mg/L) según Hidalgo (2003) (Tabla 31), a pesar de la reducción que dicho contenido parece sufrir con la supraextracción al compararlo con los testigos. Curiosamente, los niveles de NFA en los mostos de supraextracción de *Moscatel* son más altos que en los de *Palomino*, luego el hecho de que la fermentación de los primeros esté ralentizada es más una consecuencia de la presencia o no de factores de crecimiento que del contenido en nitrógeno, más directamente relacionado con la turbidez.

Efectivamente, analizando los datos de turbidez encontramos una relación con la velocidad fermentativa. Como se puede observar en la Tabla 32, los valores de turbidez

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

correspondientes a los mostos testigos de *Palomino* y a los de supraextracción de *Moscatel* se encuentran muy próximos a los valores mínimos recomendados para un buen desarrollo de la fermentación (50 NTU). Por tanto, es interesante incidir en la importancia de modular el grado y la extensión de la operación de desfogado para obtener un buen desarrollo de la fermentación alcohólica.

Tabla 33. Influencia de la maceración pelicular sobre la velocidad de fermentación de los mostos de ambas variedades

| | | t_{medio} (días) | $V_{\text{máx.}}$ (días ⁻¹) |
|----------|-------|---------------------------|--|
| Palomino | TG | 5,0 | 0,0142 |
| | SUPRA | 1,0 | 0,0148 |
| Moscatel | TG | 2,5 | 0,0216 |
| | SUPRA | 3,5 | 0,0213 |

V.2.5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO

Tras la clarificación y estabilización por frío de los vinos terminados se realizó un análisis general de los mismos para determinar la influencia de la técnica de supraextracción sobre sus características finales.

Como se puede observar en la Tabla 34, con ligeras diferencias entre variedades, los resultados muestran un efecto claro de la supraextracción sobre la composición final del vino. Fenómeno también observado por Roldán y col. (2006) en estudios previos sobre aplicación de enzimas durante el desfogado en vinos de la variedad *Palomino fino*.

Tabla 34. Análisis general de los vinos testigos y de supraextracción de ambas variedades (Media \pm DS)

| | <i>Palomino fino</i> | | <i>Moscatel de Alejandría</i> | |
|---|----------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | TG | SUPRA | TG | SUPRA |
| % v/v | 11,95 \pm 0,01 | 13,45 \pm 0,08 | 12,04 \pm 0,04 | 13,81 \pm 0,11 |
| Azúcares residuales (g/L) | 1,81 \pm 0,02 | <0,5 | <0,5 | <0,5 |
| Glicerina (g/L) | 6,31 \pm 0,92 | 6,43 \pm 0,12 | 6,71 \pm 0,34 | 6,26 \pm 0,10 |
| Acidez total (g/L ác.tartárico) | 4,99 \pm 0,02 | 5,01 \pm 0,02 | 4,55 \pm 0,08 | 5,08 \pm 0,04 |
| Acidez volátil (g/L ácido acético) | 0,252 \pm 0,002 | 0,110 \pm 0,011 | 0,441 \pm 0,001 | 0,200 \pm 0,009 |
| pH | 3,41 \pm 0,01 | 3,38 \pm 0,02 | 3,56 \pm 0,01 | 3,59 \pm 0,01 |
| IPT | 8,13 \pm 0,01 | 4,86 \pm 0,07 | 7,12 \pm 0,02 | 6,73 \pm 0,03 |
| ABS 470 | 0,033 \pm 0,001 | 0,024 \pm 0,003 | 0,042 \pm 0,001 | 0,028 \pm 0,002 |
| Tendencia pardeamiento (DABS 470) | 0,052 \pm 0,002 | 0,030 \pm 0,005 | 0,021 \pm 0,001 | 0,050 \pm 0,004 |
| Na (mg/L) | 27,0 \pm 0,2 | 30,0 \pm 0,5 | 42,6 \pm 0,4 | 30,0 \pm 0,3 |
| K (mg/L) | 585 \pm 6 | 538 \pm 4 | 838 \pm 2 | 665 \pm 1 |
| Fe (mg/L) | 0,300 \pm 0,100 | 0,500 \pm 0,010 | 0,900 \pm 0,010 | 0,160 \pm 0,020 |
| Mg (mg/L) | 53,1 \pm 0,6 | 52,0 \pm 0,5 | 57,7 \pm 0,2 | 60,0 \pm 0,5 |
| Ca (mg/L) | 95,5 \pm 0,5 | 90,0 \pm 1,0 | 70,6 \pm 0,4 | 103,7 \pm 0,5 |
| Cu (mg/L) | 0,604 \pm 0,004 | 0,500 \pm 0,002 | 1,94 \pm 0,01 | 1,36 \pm 0,07 |
| Zn (mg/L) | 2,02 \pm 0,02 | 1,68 \pm 0,06 | 5,81 \pm 0,15 | 1,82 \pm 0,09 |

Uno de los resultados más relevantes, que corrobora lo observado por otros autores (Chauvet y col., 1987; Joseph, 1992), de la aplicación de dicha técnica en las vinificaciones realizadas, es el aumento del grado alcohólico que se produce con la supraextracción en los vinos de ambas variedades, llegándose a agotar prácticamente los azúcares del mosto (azúcares residuales <0,5 g/L). Este aumento del grado alcohólico supone un 12,5 y 14,7% más de alcohol que en los vinos testigos para *Palomino* y *Moscatel* respectivamente, lo que podría deberse a una mayor extracción de factores de crecimiento con la aplicación de la supraextracción, mejorando así el proceso fermentativo en ambos casos. Por otra parte, se observa un ligero aumento de la acidez, probablemente por la liberación de ácidos orgánicos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del hollejo provocados por los desgarros y roturas del tejido. Este efecto, sin embargo, se ve contrarrestado por la liberación de sales como K y su posterior precipitación como bitartrato, de ahí que el pH de los vinos sea más bajo que con la supraextracción. De hecho en los vinos de *Moscatel* apenas hay variación del pH, a pesar de que la acidez aumenta un 10% y el K disminuye en un 21%.

Otro resultado importante es la disminución de acidez volátil que se produce con la supraextracción, que para los vinos de ambas variedades supera el 55%. A pesar de que la turbidez en los mostos de *Moscatel* de supraextracción era muy baja, la acidez volátil fue también muy baja al contrario de lo que cabía esperar según Hidalgo (2003). Esta bajada de la acidez volátil nos indica junto con el contenido de glicerina más o menos estable en ambos tratamientos, que no existen desviaciones del metabolismo de las levaduras hacia la producción de metabolitos secundarios como el ácido acético.

El IPT y la absorbancia a 470 nm de los vinos son otros de los parámetros que se ve afectados por la técnica de supraextracción de manera que, para ambas variedades el índice de polifenoles y su oxidación (Abs 470 nm) disminuye considerablemente. Sobre todo en los vinos de *Palomino*, los cuales muestran una reducción del -40,2 y -27% para IPT y Abs 470 nm respectivamente frente al testigo. Esta disminución favorece el hecho de que los vinos de *Palomino* de supraextracción presenten menor tendencia al pardeamiento, por el contrario de lo que ocurre con los vinos *Moscatel*, que a pesar de la disminución de IPT (5,5%) y de Abs 470 nm, presenta mayor tendencia al pardeamiento debido probablemente a una menor estabilidad de los compuestos polifenólicos extraídos aplicando la supraextracción.

Atendiendo a los compuestos minerales, cabe destacar que, a pesar de que el Cu y el Zn aumentan en el mosto con la supraextracción, en los vinos los niveles de éstos tras la fermentación son mucho más bajos con la aplicación de dicha técnica, lo que parece indicar que ambos cationes pueden actuar como activadores de la fermentación (Han y col., 2006; Kirchman y Botta, 2007).

Según Razungles y col. (2000), la técnica de Flash-expansión produce también roturas del hollejo facilitando la extracción de componentes del mismo siendo así comparable a la técnica de supraextracción. El inconveniente de dicha técnica para la elaboración de vinos blancos según dichos autores es que se produce un aumento considerable de polifenoles, que en el caso de los tintos puede llegar a ser incluso del 50%. Como se ve en nuestros resultados, la supraextracción ofrece muchas ventajas en este sentido, ya que, además del aumento del grado alcohólico y la disminución de acidez volátil como datos más destacables comparados con los resultados obtenidos con Flash-expansión en vinificaciones tintas, el índice de polifenoles disminuye en más del 50% con la supraextracción así como la oxidación de los vinos.

V.2.6. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO

Las Fig. 48 y 49 muestran la localización de las muestras de vinos testigos y de supraextracción de ambas variedades en el plano de color (a^*b^*) del espacio CIELAB y los valores L^* (luminosidad o claridad) de dichas muestras frente a sus valores C^* (croma o saturación) respectivamente.

Atendiendo a la localización de las muestras en el plano CIELAB (Fig. 48), se observa que los vinos procedentes de supraextracción se localizan más a la derecha y más abajo que sus correspondientes testigos, encontrándose entre las coordenadas -0,500 y -0,800 del eje a^* y 3,5 y 5,0 del eje b^* . Estos resultados nos indican que los vinos de supraextracción presentan un color más amarillo que los testigos, sobre todo en el caso del *Palomino*.

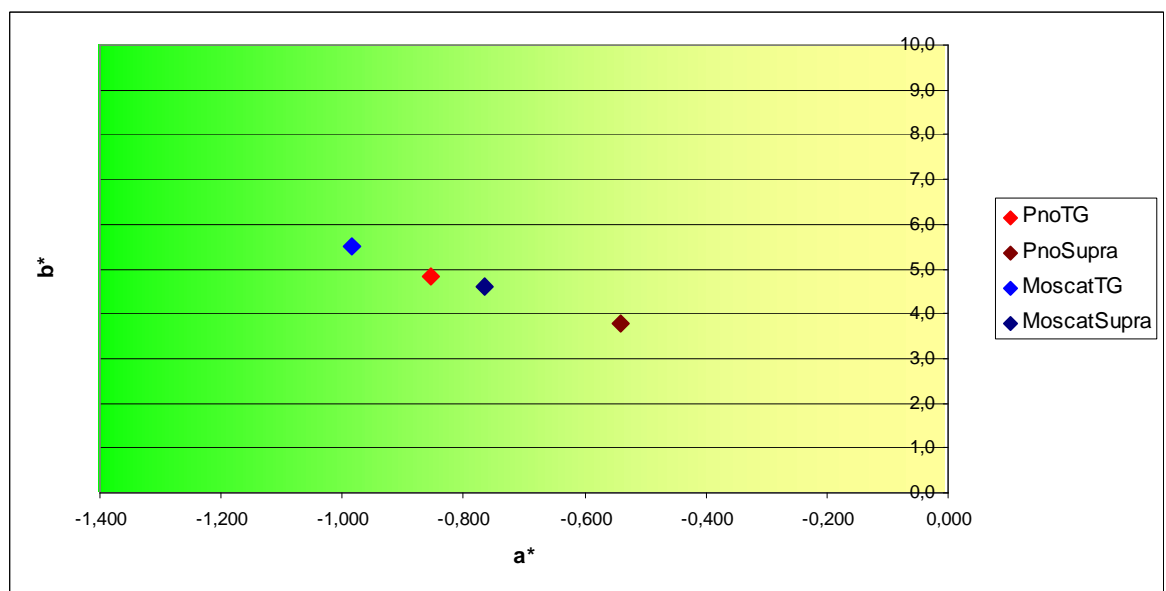


Fig. 48. Representación de los vinos de testigos y supraextracción *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* en el plano de color a^*b^* del espacio CIELAB

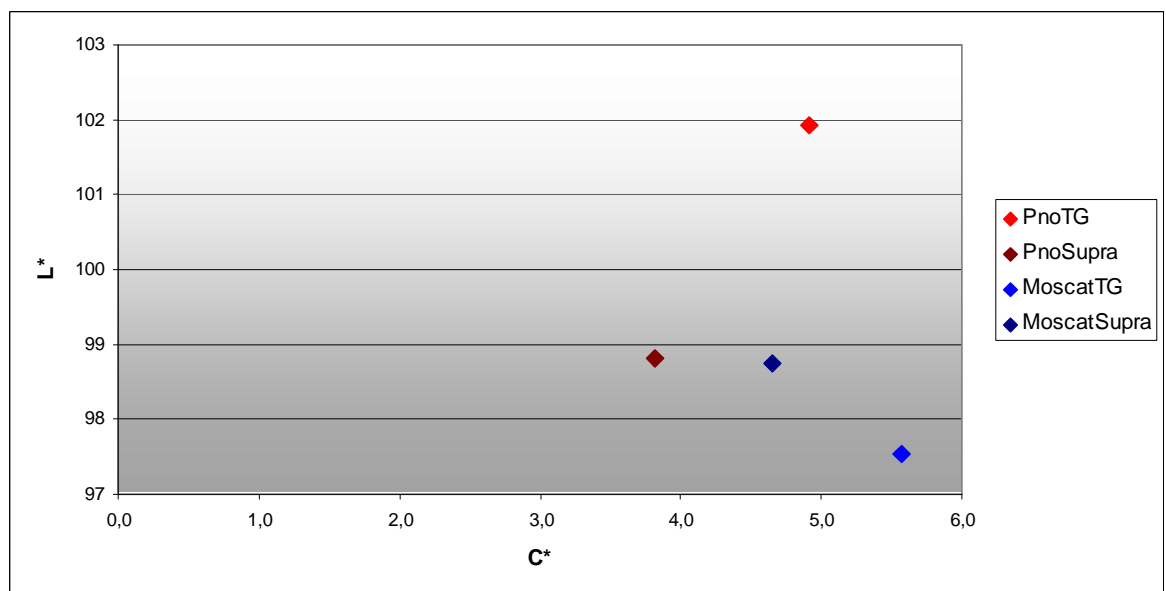


Fig.49. Representación de los valores L^* de los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* frente a los valores C^*

Por otra parte, la Fig. 49 nos muestra que los vinos de supraextracción de ambas variedades presentan la misma luminosidad, siendo para los vinos de *Palomino* mucho más baja que los testigos y para los de *Moscatel* ligeramente superior. La cromaticidad sin embargo, es más baja para ambos tipos de vino encontrándose a valores entre 3,5 y 5. Luego los vinos de supraextracción presentan mayor intensidad pero están menos saturados que los vinos testigo.

Por lo tanto, los vinos de supraextracción presentan en general un color más amarillo de gran intensidad, pero ligeramente menos saturado que los testigos, existiendo diferencias más notables entre los vinos de *Palomino* testigo y de supraextracción que entre los de *Moscatel*. Atendiendo a Gómez-Míguez y col. (2006), con dicha técnica, el color de los vinos se ve ligeramente modificado de manera que estarían dentro de los niveles aceptables de luminosidad (> 90) y coordenada a^* (-0,86 a 1,32) pero ligeramente por debajo de los niveles de b^* (5,40 a 21,30).

V.2.7. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO

Al igual que en maceración pelicular, en la composición aromática de los vinos distinguimos entre la influencia de la supraextracción sobre los aromas mayoritarios, constituidos principalmente por los alcoholes superiores y los compuestos carbonilo, y los compuestos volátiles minoritarios: ácidos orgánicos, terpenos y derivados, alcoholes, ésteres, fenoles volátiles y tioles.

2.7.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios

Como se puede observar en la Figura 50, para ambos tipos de vino la técnica de supraextracción parece tener un efecto global variable dependiendo del tipo de uva, así, mientras que en los vinos de *Palomino* se produce un aumento de los alcoholes superiores de más de un 100%, en los vinos de *Moscatel* éstos prácticamente se mantienen debido a una ligera disminución de los alcoholes isoamílicos.

Los contenidos en metanol, 1-propanol y 2-metil-1-propanol en cambio, y como se mostraba en estudios previos (Roldán y col., 2006), se incrementan para ambos tipos de vino siendo dicho incremento de más del 80% para los de *Palomino*. Los residuos pécticos, principalmente celulosa y pectinas, liberados del tejido celular a causa de los daños y roturas que la supraextracción en el mismo, son el sustrato idóneo para enzimas pectolíticas como las pectin-metilesterasas, las cuales actúan sobre dichos residuos liberando metanol. Por otra parte, esos daños producen también la liberación de residuos nitrogenados que actúan como precursores de alcoholes superiores como 1-propanol y 2-metil-1-propanol, en detrimento de otros como los alcoholes isoamílicos (González y col., 1992; Pretorius, 2000).

Es importante señalar que, con respecto a los isoamílicos se repite el mismo fenómeno que con la maceración pelicular. Es decir, mientras que en los vinos de *Moscatel* éstos se mantienen prácticamente invariables, en los vinos de *Palomino* se produce un aumento muy significativo (120 y 130% para 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol respectivamente). Nuevamente esto estaría relacionado con el contenido de aminoácidos de los mostos, determinado por la técnica de extracción (supraextracción), y su evolución durante la fermentación, lo que también marcaría diferencias entre los tipos de vino.

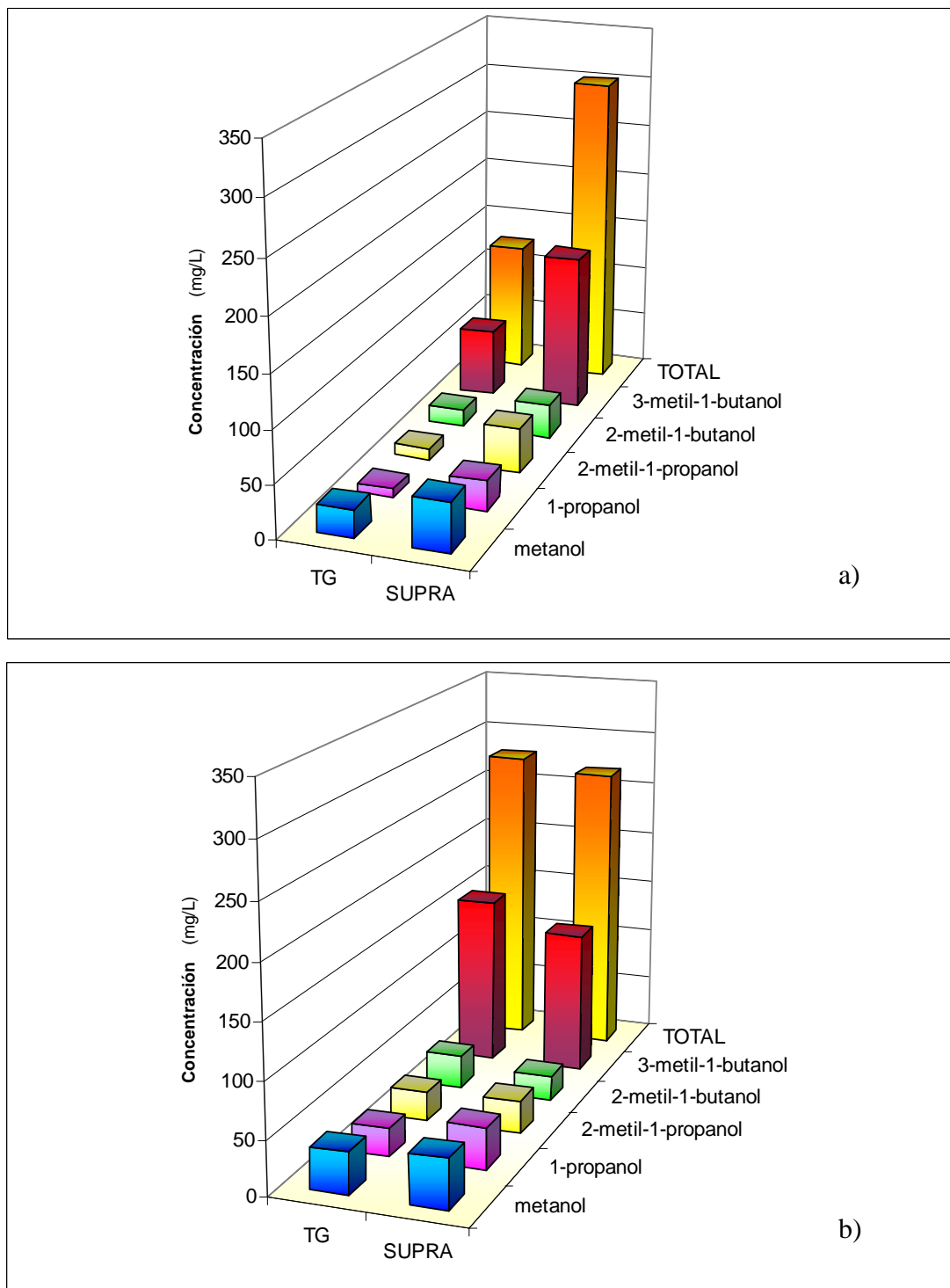


Fig.50. Influencia de la supraextracción sobre la concentración de alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Palomino fino* (a) y *Moscatel de Alejandría* (b)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atendiendo a los compuestos carbonilo, en la Tabla 35 se observa que la aplicación de la supraextracción conduce a un aumento del contenido en compuestos carbonilo en un 60 y 34% para *Palomino* y *Moscatel* respectivamente. Sin embargo, mientras que en los vinos de *Palomino* dicho aumento se debe a un aumento del contenido en acetato de etilo, en los vinos de *Moscatel* se debe al acetaldehído.

Tabla 35. Concentración de compuestos carbonilo (mg/L) en los vinos testigo y de supraextracción de las variedades *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*.

| COMPUESTOS CARBONILO (mg/L) | <i>Palomino fino</i> | | <i>Moscatel de Alejandría</i> | |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | TG | SUPRA | TG | SUPRA |
| Acetaldehído | 17,0 ± 1,1 | 17,0 ± 0,8 | 17,0 ± 1,0 | 28,0 ± 1,8 |
| Acetato etilo | 8,0 ± 1,5 | 21,0 ± 3,1 | 24,0 ± 0,9 | 24,0 ± 0,7 |
| Acetal | ns | 2,0 ± 0,1 | ns | 3,0 ± 0,2 |
| TOTAL | 25,0 ± 2,6 | 40,0 ± 3,1 | 41,0 ± 1,9 | 55,0 ± 1,8 |

2.7.2. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios

Atendiendo al contenido en compuestos aromáticos minoritarios (Tabla 36) y su distribución con respecto al aroma total, en la Fig. 51 se puede observar que, con independencia de la distribución propia de cada variedad, la supraextracción tiene un efecto sobre la distribución de compuestos aromáticos de los vinos de ambas variedades. Así, el contenido total de aromas (Tabla 36) disminuye para ambos tipos de vinos con el empleo de esta técnica, debido a una disminución global de todas las familias de aromas a excepción de los compuestos terpénicos y derivados. Sin embargo, la proporción de cada familia aromática con respecto al global disminuye para los ácidos y tioles y aumenta para los compuestos terpénicos y ésteres. La proporción de alcoholes y fenoles volátiles, por otra parte, presentan ligeras diferencias según la variedad.

Tabla 36. Concentración de compuestos aromáticos ($\mu\text{g/L}$) en los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* testigos y de supraextracción ($M \pm SD$)

| | <i>Palomino fino</i> | | <i>Moscatel de Alejandría</i> | |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | TG | SUPRA | TG | SUPRA |
| ACIDOS | | | | |
| Isobutírico | 5,20 \pm 1,63 | 3,41 \pm 0,25 | ns | ns |
| Isovalérico | 31,61 \pm 2,50 | 12,81 \pm 2,66 | 6,36 \pm 0,26 | 12,27 \pm 1,39 |
| Hexanoico | 392,03 \pm 4,37 | 320,34 \pm 10,14 | 400,95 \pm 31,95 | 420,80 \pm 4,68 |
| Heptanoico | 3,48 \pm 1,14 | 5,36 \pm 0,26 | 13,64 \pm 0,34 | 2,70 \pm 2,58 |
| Octanoico | 971,99 \pm 30,35 | 526,09 \pm 63,05 | 1443,47 \pm 172,34 | 434,98 \pm 134,70 |
| Decanoico | 27,99 \pm 10,67 | 26,93 \pm 0,15 | 1544,69 \pm 8,86 | ns |
| 10-undecenoico | 52,84 \pm 15,49 | 2,00 \pm 7,19 | 113,27 \pm 1,24 | ns |
| Geránico | 241,76 \pm 30,88 | 24,92 \pm 30,67 | 35,19 \pm 4,06 | 27,51 \pm 1,81 |
| 2-hexenoico | ns | 2,67 \pm 0,83 | ns | ns |
| Total ácidos | 1726,90 \pm 38,50 | 924,54 \pm 59,61 | 3557,58 \pm 327,42 | 898,26 \pm 123,05 |
| p.100 total | 43,67 | 39,92 | 50,24 | 24,80 |
| TERPENOS Y DERIVADOS | | | | |
| Linalool | ns | 47,20 \pm 9,44 | 109,91 \pm 8,17 | 154,84 \pm 10,59 |
| a-terpineol | ns | 26,09 \pm 5,22 | 78,65 \pm 6,83 | 96,40 \pm 4,18 |
| Citronelol | 4,12 \pm 0,31 | 25,38 \pm 3,01 | 50,84 \pm 3,01 | 74,27 \pm 5,52 |
| Nerol | ns | 10,10 \pm 2,02 | 10,92 \pm 5,02 | 21,51 \pm 2,50 |
| Geraniol | ns | ns | 29,33 \pm 10,81 | 14,27 \pm 3,55 |
| trans-óxido de linalool | ns | 1,09 \pm 0,22 | 1,89 \pm 0,53 | 4,61 \pm 0,64 |
| cis-óxido linalool | ns | 4,58 \pm 0,92 | 7,18 \pm 2,84 | 15,10 \pm 1,87 |
| 6,7-dihidro-7-hidroxilinalol | ns | ns | 11,46 \pm 1,64 | 24,74 \pm 3,13 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 24,35 \pm 0,73 | 119,76 \pm 13,49 | 525,50 \pm 109,26 | 478,12 \pm 11,17 |
| 2,6-dimetil-7-octen-2,6-diol | ns | 8,86 \pm 1,77 | 11,46 | 24,74 \pm 3,13 |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | ns | ns | 6,02 \pm 1,97 | 6,30 \pm 0,07 |
| 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol | ns | 13,58 \pm 2,72 | 106,31 \pm 39,59 | 68,75 \pm 8,85 |
| Total terpenos y derivados | 28,48 \pm 0,85 | 256,64 \pm 15,27 | 938,00 \pm 69,70 | 983,65 \pm 8,06 |
| p.100 total | 0,72 | 11,08 | 13,25 | 27,20 |
| ALCOHOLES | | | | |
| Isobutanol | 2,90 \pm 0,35 | 6,10 \pm 0,45 | ns | 3,1 \pm 0,62 |
| Isopropanol | ns | 1,94 \pm 0,39 | ns | ns |
| Isohexanol | 1,78 \pm 0,24 | 1,64 \pm 0,02 | ns | 0,79 \pm 0,16 |
| 3-metil-1-pentanol | 0,71 \pm 0,46 | 3,43 \pm 0,38 | 0,39 \pm 0,14 | 2,24 \pm 0,43 |
| 1-butanol | ns | 0,09 \pm 0,02 | ns | ns |
| 1-pentanol | ns | 0,65 \pm 0,13 | ns | 0,47 \pm 0,09 |
| 1-hexanol | 110,10 \pm 6,26 | 27,83 \pm 11,64 | 12,65 \pm 3,44 | 21,48 \pm 2,08 |
| trans-3-hexen-1-ol | 0,96 \pm 0,11 | 0,25 \pm 0,10 | ns | 0,16 \pm 0,03 |
| cis-3-hexen-1-ol | 6,95 \pm 0,71 | 4,83 \pm 0,30 | 0,67 \pm 0,66 | 2,53 \pm 0,44 |
| 1-octen-3-ol | ns | 1,05 \pm 0,21 | ns | 1,12 \pm 0,22 |
| 1-octanol | 3,18 \pm 0,02 | 2,86 \pm 0,57 | 2,35 \pm 0,40 | 2,94 \pm 0,14 |
| 2-etilhexanol | ns | 1,43 \pm 0,29 | 1,17 \pm 0,14 | ns |
| 3-etil-2-pentanol | ns | ns | 0,48 \pm 0,36 | ns |
| Nonanol | ns | ns | 2,75 \pm 0,71 | ns |
| Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-piran-3-ol | ns | 20,11 \pm 4,02 | 77,45 \pm 10,53 | 91,07 \pm 3,21 |
| Butoxietanol | ns | ns | 11,67 \pm 3,03 | 3,86 \pm 1,84 |
| Alcohol fenilético | 1457,09 \pm 32,53 | 519,80 \pm 83,55 | 1547,92 \pm 115,07 | 819,43 \pm 171,71 |
| 3-etanolindol | ns | ns | 91,74 \pm 22,49 | ns |
| Total alcoholes | 1583,68 \pm 99,58 | 592,01 \pm 70,00 | 1749,25 \pm 147,19 | 949,19 \pm 188,57 |
| p.100 total | 40,05 | 25,56 | 24,70 | 26,20 |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | 5,35 \pm 0,46 | ns | ns | ns |
| 2,6-diterbutil-4-etilfenol | 9,63 \pm 1,02 | 5,77 \pm 0,55 | 12,23 \pm 3,25 | 10,39 \pm 0,43 |
| Total fenoles volátiles | 14,98 \pm 0,46 | 5,77 \pm 0,55 | 12,23 \pm 2,97 | 10,39 \pm 0,43 |
| p.100 /total | 0,38 | 0,25 | 0,17 | 0,29 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 36 (continuación). Concentración de compuestos aromáticos ($\mu\text{g/L}$) en los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* testigos y de supraextracción ($M \pm SD$)

| (continuación) | <i>Palomino fino</i> | | <i>Moscatel de Alejandría</i> | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| | TG | SUPRA | TG | SUPRA |
| ÉSTERES | | | | |
| Acetato de isoamilo | 23,49 \pm 2,97 | 73,80 \pm 7,11 | 0,78 \pm 1,41 | 76,85 \pm 17,93 |
| Acetato de hexilo | 2,61 \pm 0,38 | 0,98 \pm 0,23 | 0,30 \pm 0,03 | 3,80 \pm 0,82 |
| Acetato de cis-hexenilo | ns | 0,05 \pm 0,01 | ns | ns |
| Acetato de feniletilo | 83,66 \pm 6,09 | 50,31 \pm 4,72 | 289,14 \pm 60,91 | 167,31 \pm 28,71 |
| Butirato de etilo | 0,53 \pm 0,07 | 2,53 \pm 0,28 | ns | 1,51 \pm 0,30 |
| Hexanoato de etilo | 19,76 \pm 2,19 | 41,77 \pm 3,11 | 5,23 \pm 2,24 | 55,26 \pm 11,79 |
| Heptanoato de etilo | 0,19 \pm 0,01 | 0,21 \pm 0,01 | ns | 0,31 \pm 0,06 |
| 2-hexenoato de etilo | ns | ns | ns | 1,50 \pm 0,30 |
| Lactato de etilo | 1,47 \pm 0,05 | 4,25 \pm 0,39 | ns | ns |
| Octanoato de etilo | 117,89 \pm 7,73 | 140,58 \pm 3,21 | 175,22 \pm 17,16 | 181,46 \pm 1,47 |
| 2-butenato de etilo | ns | 0,06 \pm 0,01 | ns | ns |
| 3-hexenoato de etilo | ns | 0,23 \pm 0,03 | ns | ns |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 5,56 \pm 0,20 | 3,94 \pm 0,23 | 3,26 \pm 0,75 | 7,10 \pm 0,91 |
| 2-hidroxí-4-metilpentanoato de etilo | 6,83 \pm 0,52 | ns | ns | ns |
| Malonato de dietilo | 0,16 \pm 0,03 | 0,20 \pm 0,05 | ns | ns |
| Decanoato de etilo | 21,21 \pm 4,90 | 22,14 \pm 0,13 | 166,99 \pm 39,37 | 27,33 \pm 32,92 |
| Succinato de dietilo | 50,81 \pm 3,00 | 61,68 \pm 1,54 | 67,78 \pm 12,99 | 151,06 \pm 19,63 |
| 9-Decenoato de etilo | 82,77 \pm 4,51 | 31,56 \pm 7,24 | 37,11 \pm 6,42 | 21,22 \pm 3,74 |
| 2-etilhexanoato de metilo | ns | ns | ns | 79,33 \pm 15,87 |
| Pentadecanoato de etilo | 168,91 \pm 9,81 | 99,34 \pm 9,84 | ns | ns |
| Caproato de isoamilo | ns | ns | ns | ns |
| 2-hexenoato de etilo | 0,27 \pm 0,09 | ns | ns | ns |
| Laurato de etilo | ns | ns | 12,83 \pm 3,33 | ns |
| Cinamato de etilo | 4,80 \pm 5,98 | ns | 59,63 \pm 15,47 | 5,88 \pm 0,02 |
| Total ésteres | 590,94 \pm 16,74 | 533,63 \pm 8,10 | 818,26 \pm 97,83 | 779,92 \pm 3,62 |
| p.100 total | 14,94 | 23,04 | 11,56 | 21,53 |
| ALDEHIDOS | | | | |
| Nonanal | ns | ns | 0,30 \pm 0,04 | ns |
| Decanal | ns | ns | 2,20 \pm 0,57 | ns |
| Total aldehídos | ns | ns | 2,50 \pm 0,65 | ns |
| p.100/total | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,00 |
| TIOLES | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 9,13 \pm 0,64 | 3,42 \pm 0,81 | 2,96 \pm 0,23 | 1,26 \pm 0,40 |
| Total tioles | 9,13 \pm 0,64 | 3,42 \pm 0,81 | 2,96 \pm 0,23 | 1,26 \pm 0,40 |
| p.100/total | 0,23 | 0,15 | 0,04 | 0,03 |
| TOTAL AROMAS | 3954,09 \pm 72,13 | 2316,02 \pm 160,33 | 7092,24 \pm 881,04 | 3622,7 \pm 805,13 |

ns: no se detecta

En cuanto a la proporción de ácidos, la supraextracción provoca una disminución del -46,5 y -74,7% en los vinos de *Palomino* y *Moscatel* respectivamente debido principalmente a la disminución del contenido en ácido octanoico (Tabla 36) (45,8 y 69,9% respectivamente). Por otra parte, disminuyen también de manera importante el ácido geránico en los vinos de

Palomino y el ácido decanoico en los de *Moscatel*, llegando este último incluso a no detectarse en los vinos de supraextracción.

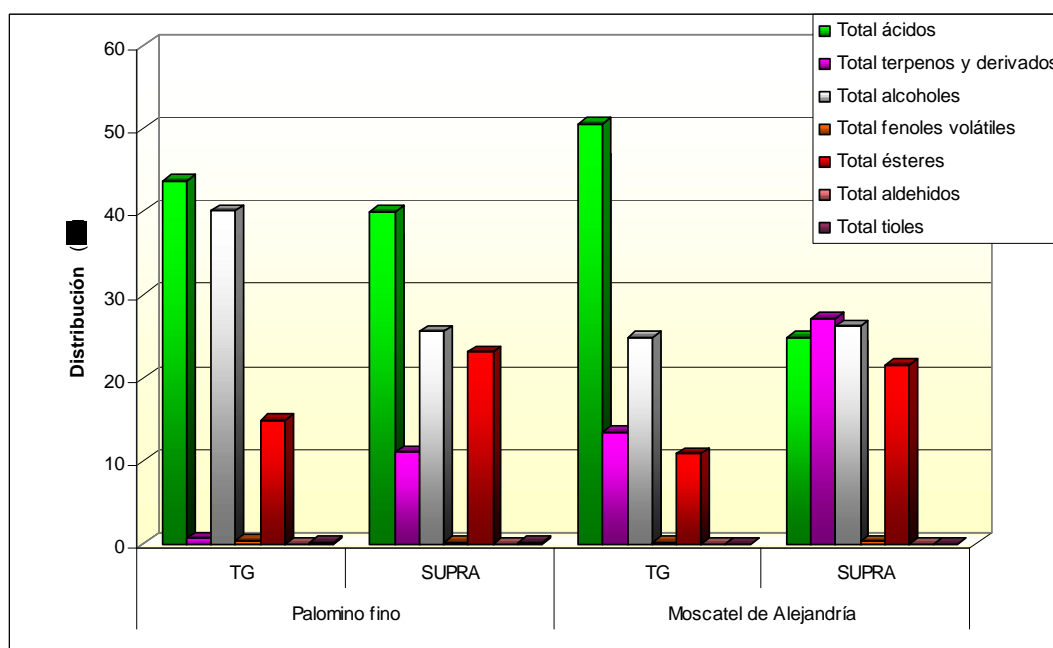


Fig. 51. Distribución de compuestos aromáticos minoritarios (%) en los vinos control y de supraextracción de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*.

Con la supraextracción, aumenta también el contenido en terpenos y su proporción con respecto al aroma total del vino. Como se puede observar en la tabla 36, para ambos tipos de vinos se produce un aumento de linalool, α -terpineol, citronelol, nerol y el derivado 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol, aunque dicho aumento es más notable en el caso de los vinos *Palomino* (801,1%). Luego las roturas del hollejo producidas durante la supraextracción favorecen, en mayor medida que incluso la maceración pelicular, la extracción de precursores y compuestos aromáticos y su posterior difusión al mosto, incluso en variedades consideradas neutras como la *Palomino* (Genovés y col., 2005).

De hecho, en los vinos de *Palomino* dicho aumento no sólo se debe a un aumento del citronelol y el 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol, sino que también se encuentran a altos niveles

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el linalool, α -terpineol y nerol, compuestos no referenciados anteriormente para esta variedad.

En cuanto a los ésteres, la proporción de éstos aumenta también en los vinos de supraextracción (35,1 y 46,3% para *Palomino* y *Moscatel* respectivamente) sin embargo, su contenido total es ligeramente más bajo en ambos casos (9,6 y 4,6% para *Palomino* y *Moscatel* respectivamente) debido a la disminución acusada del 9-decenoato de etilo y, sobre todo, el acetato de feniletilo. Sin embargo, hay que destacar un aumento significativo del acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo para ambos tipos de vino.

Al igual que la gran mayoría de compuestos aromáticos, el contenido en alcoholes también disminuye con la supraextracción observándose también una disminución en la proporción de los mismos con respecto al total de aromas. Para los vinos de *Palomino* esta disminución es superior al 60% mientras que en los de *Moscatel* no llega al 50% (45,7%). El principal responsable del bajo contenido en alcoholes en los vinos de supraextracción es el 2-feniletanol, que en ningún caso supera 1 mg/L. Luego, estos resultados nos indican que la supraextracción, al igual que la maceración pelicular, debería favorecer la liberación de compuestos nitrogenados al mosto aumentando su contenido en nitrógeno fácilmente asimilable y favoreciendo la formación de alcoholes. Sin embargo, los niveles de FAN y el contenido en alcoholes de los vinos de supraextracción parecen indicar un déficit de aminoácidos como la fenilalanina, origen del 2-feniletanol, con lo cual podría existir una pérdida de los mismos durante el desfogado.

2.7.3. Influencia sobre el valor de aroma

Para determinar la influencia de la supraextracción sobre el valor de aroma se calcularon los VAOs correspondientes a cada uno de los compuestos analizados. En la Tabla

37 se muestra el valor de aroma activo de cada compuesto clasificado por familias así como la suma de cada una de ellas. Para la realización de dicha tabla sólo se han tenido en cuenta aquellos compuestos que presentaban VAOs superiores a 0,01.

Tabla 37. Influencia de la supraextracción sobre el perfil aromático (VAO) de los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

| | <i>Palomino fino</i> | | <i>Moscatel de Alejandría</i> | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|----|
| | TG | SUPRA | TG | SUPRA | |
| ACIDOS | | | | | |
| Isovalérico | 0,958 ± 0,076 | 0,388 ± 0,081 | 0,193 ± 0,008 | 0,372 ± 0,042 | L |
| Hexanoico | 0,933 ± 0,010 | 0,763 ± 0,024 | 0,955 ± 0,076 | 1,002 ± 0,011 | H |
| Octanoico | 1,944 ± 0,061 | 1,052 ± 0,126 | 2,887 ± 0,345 | 0,870 ± 0,269 | L |
| Decanoico | 0,028 ± 0,011 | 0,027 ± 0,000 | 1,545 ± 0,009 | - | DO |
| Total ácidos | 3,863 ± 0,076 | 2,230 ± 0,126 | 5,580 ± 0,345 | 2,244 ± 0,269 | |
| TERPENOS Y DERIVADOS | | | | | |
| Linalool | - | 3,146 ± 0,629 | 7,327 ± 0,545 | 10,323 ± 0,706 | F |
| α-terpineol | - | 0,104 ± 0,020 | 0,315 ± 0,027 | 0,386 ± 0,017 | F |
| Citronelol | 0,041 ± 0,003 | 0,254 ± 0,030 | 0,508 ± 0,030 | 0,743 ± 0,055 | F |
| Nerol | - | 0,020 ± 0,004 | 0,022 ± 0,010 | 0,043 ± 0,005 | F |
| Geraniol | - | - | 0,978 ± 0,360 | 0,476 ± 0,118 | F |
| trans-óxido de linalool | - | 0,182 ± 0,037 | 0,315 ± 0,088 | 0,768 ± 0,107 | F |
| cis-óxido linalool | - | 0,763 ± 0,153 | 1,197 ± 0,473 | 2,517 ± 0,312 | F |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | - | - | 0,312 ± 0,018 | 0,057 ± 0,000 | F |
| Total terpenos y derivados | 0,041 ± 0,003 | 4,469 ± 0,629 | 10,974 ± 0,545 | 15,313 ± 0,706 | |
| ALCOHOLES | | | | | |
| 1-hexanol | 0,100 ± 0,005 | 0,025 ± 0,011 | 0,012 ± 0,003 | 0,019 ± 0,002 | H |
| cis-3-hexen-1-ol | 0,017 ± 0,002 | 0,012 ± 0,001 | 0,002 ± 0,002 | 0,006 ± 0,001 | H |
| Alcohol feniletilo | 0,146 ± 0,003 | 0,052 ± 0,008 | 0,155 ± 0,012 | 0,082 ± 0,017 | F |
| Total alcoholes | 0,265 ± 0,005 | 0,090 ± 0,011 | 0,169 ± 0,012 | 0,108 ± 0,017 | |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | | |
| 2-metoxi-4-vinilfenol | 0,134 ± 0,012 | - | - | - | E |
| Total fenoles volátiles | 0,134 ± 0,012 | - | - | - | |
| ÉSTERES | | | | | |
| Acetato de isoamilo | 0,783 ± 0,099 | 2,460 ± 0,237 | 0,026 ± 0,047 | 2,562 ± 0,598 | A |
| Acetato de feniletilo | 0,335 ± 0,024 | 0,201 ± 0,019 | 1,156 ± 0,243 | 0,669 ± 0,115 | F |
| Butirato de etilo | 0,530 ± 0,070 | 2,530 ± 0,280 | - | 1,510 ± 0,001 | A |
| Hexanoato de etilo | 3,952 ± 0,438 | 8,354 ± 0,622 | 1,046 ± 0,448 | 11,052 ± 2,358 | A |
| Octanoato de etilo | 23,578 ± 1,546 | 28,116 ± 0,642 | 35,044 ± 3,432 | 36,292 ± 0,294 | A |
| Decanoato de etilo | 0,106 ± 0,024 | 0,111 ± 0,001 | 0,835 ± 0,197 | 0,137 ± 0,165 | A |
| Succinato de dietilo | 0,042 ± 0,002 | 0,051 ± 0,002 | 0,056 ± 0,011 | 0,126 ± 0,016 | A |
| Laurato de etilo | - | - | 0,128 ± 0,033 | - | H |
| Cinamato de etilo | 4,800 ± 5,98 | - | 59,630 ± 15,470 | 5,880 ± 0,021 | A |
| Total ésteres | 34,126 ± 1,546 | 41,823 ± 0,642 | 97,921 ± 15,470 | 58,223 ± 2,358 | |
| ΣVAOS | 38,427 ± 1,546 | 48,611 ± 0,642 | 114,644 ± 15,470 | 75,888 ± 2,358 | |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en dicha tabla, y al igual que ocurría con el contenido en compuestos aromáticos, mientras que el valor de aroma global aumenta para los vinos de *Palomino* (52,5%) con la aplicación de la supraextracción, en el caso de los vinos de *Moscatel* disminuye (-33,8%) como consecuencia de una disminución del valor de aroma de ácidos y ésteres (-59,7 y -40,5% respectivamente). En los vinos de *Palomino* también se observa una disminución del valor de aroma de los ácidos causado igualmente por una disminución del ácido octanoico (-45,9%).

Sin embargo, a pesar de que el contenido en ésteres disminuye con la supraextracción, el valor de aroma de dicha familia aumenta. Esto se debe a que por una parte, para ambas variedades la supraextracción conlleva a un aumento del valor de aroma del acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y butirato de etilo superior al 50% para ambas variedades, así como de succinato de dietilo (21,4 y 125% para *Palomino* y *Moscatel* respectivamente) relacionado con un aumento de su contenido. Sin embargo, por otra se produce una disminución del contenido en cinamato de etilo (-100% en *Palomino* y -90% en *Moscatel*) que presenta un umbral de percepción de 1 µg/L y en los vinos control de *Moscatel* se encuentra a concentraciones muy altas (> 50 µg/L).

Asimismo, para los vinos de ambas variedades, la supraextracción condujo a un aumento del valor de aroma de los compuestos terpénicos del 10.865 y 39,5% para los vinos de *Palomino* y *Moscatel* respectivamente, lo que está relacionado también con el mayor contenido de compuestos aromáticos de dicha familia, principalmente linalol, citronelol y trans- y cis-óxido de linalol.

En cuanto a los alcoholes, la supraextracción produce una disminución del valor de aroma de los mismos directamente relacionado con la disminución de su contenido y, sobre todo, con la disminución de 1-hexanol y 2-feniletanol.

Como se puede observar en la Fig. 52, la supraextracción aumenta las series floral y otros y disminuye las herbácea, láctica y de oxidación para ambos tipos de vino. Sin embargo, las series afrutada y especiada parecen depender más de la variedad, ya que mientras que en los vinos de *Palomino* se observa un aumento de la serie afrutada, en los vinos de *Moscatel* disminuye a consecuencia de la disminución del cinamato de etilo.

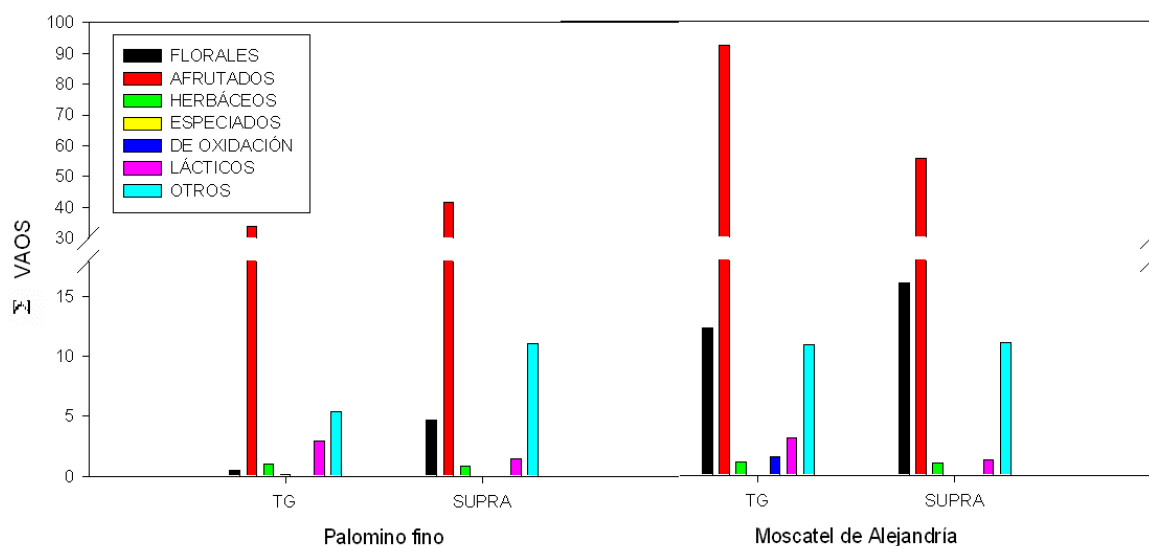


Fig. 52. Influencia de la supraextracción sobre Σ VAOs de los vinos de uva *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

El aumento de la serie floral se debe al aumento del valor de aroma de terpenoles y derivados que en el caso de los vinos de *Palomino* es más considerable. El 2-feniletanol y el acetato de feniletilo, que contribuyen también a dicha serie disminuyen con la supraextracción.

La serie otros, determinada por los alcoholes superiores y compuestos carbonilo aumenta de manera importante en los vinos de *Palomino* debido al aumento en la contribución del 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol de más de un 50% (74,3, 54,5 y 56,7% respectivamente).

V.2.8. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO

Como se puede observar en la Fig. 53, la valoración sensorial realizada por el panel de catadores mostró que los vinos de *Palomino* de supraextracción presentan respecto al testigo, valores más elevados y significativos ($p < 0,01$) en todos los parámetros a excepción de la acidez, intensidad de color y persistencia. Lo más relevante de los resultados de cata fue que la supraextracción produce vinos con mayor aromaticidad, algo significativo cuando intentamos vinificar una variedad neutra como la *Palomino fino*. Dichos vinos se valoraron como más florales y sobre todo afrutados, con notas a piña, pera, ciruela y a otros aromas como el caramelo y las pasas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el perfil aromático de dichos vinos.

Sin embargo, en el caso de la *Moscatel* los vinos de supraextracción no mostraron grandes diferencias con respecto al testigo, a excepción de una mayor intensidad aromática pero de inferior calidad. A pesar del carácter floral y afrutado que presentaron dichos vinos, los aromas detectados se identificaron con los aromas característicos de la propia variedad, aromas amoscatelados, no resaltando ninguna nota en particular.

Los resultados obtenidos para ambas variedades confirman los obtenidos en el análisis de aromas. Así, el aumento de compuestos volátiles en los vinos de *Palomino* se reflejó en una mayor intensidad y calidad de aroma resaltando su carácter afrutado y floral. Mientras que en los vinos *Moscatel*, la disminución del contenido en aromas se reflejó más en una disminución de la calidad de aroma que de intensidad, debido probablemente a la disminución de aromas afrutados.

Por tanto, para el panel de catadores, la supraextracción se adaptó mejor a la variedad neutra que a la aromática.

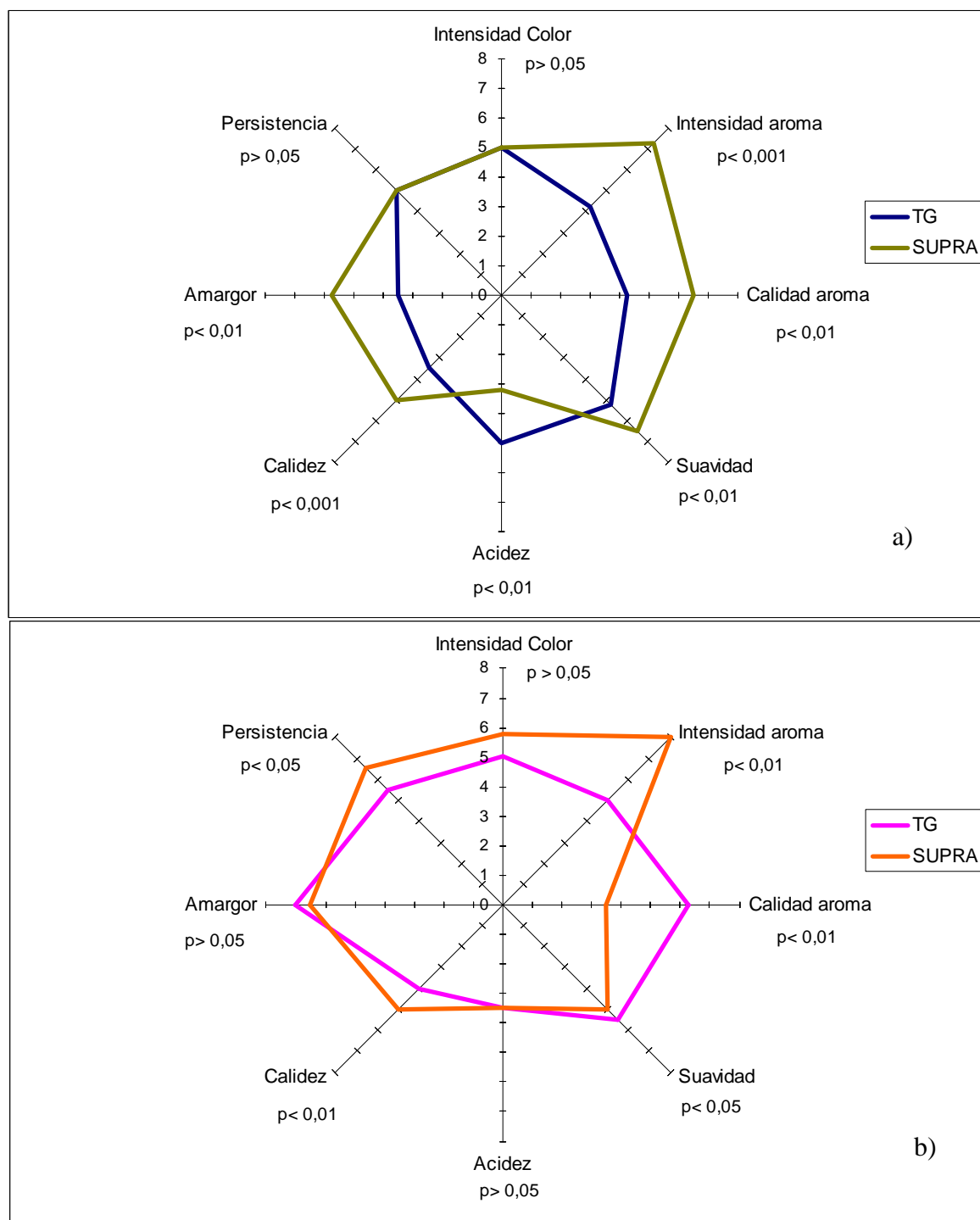


Fig. 53. Análisis sensorial comparativo entre los vinos testigo y de supraextracción de las variedades *Palomino fino* (a) y *Moscatel de Alejandría* (b)

V.3. EMPLEO DE CEPAS DE LEVADURA ESPECÍFICAS EN LA ELABORACIÓN DE VINOS DE *Palomino fino* Y *Moscatel de Alejandría*

V.3.1. INFLUENCIA DE LA CEPA DE LEVADURA SOBRE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Tras la corrección de pH, la adición de sulfuroso y la operación de desfangado (24 horas a 20°C), el mosto de *Palomino* y *Moscatel* se dividió en cuatro fracciones cada una de las cuales se inoculó con los distintos preparados comerciales de LSA, a excepción del “pie de cuba” (considerado testigo del ensayo), denominados: FERMIVIN, ENSIS-L5 y CK S-102, todas ellas del género *Saccharomyces cerevisiae* y previamente descritas en el apartado 1.2.3. de Material y Métodos.

Durante la fermentación, se realizó un seguimiento de cada una de las cepas controlando la densidad del mosto y la biomasa. Como se puede observar en las Figuras 54 y 55, las cuatro cepas de levadura presentaron un buen desarrollo de la fermentación independientemente de la procedencia del mosto utilizado, existiendo sólo ligeras diferencias en la velocidad fermentativa. El tiempo de latencia fue más elevado en los mostos de *Moscatel* debido a los altos niveles de sulfuroso iniciales a los cuales se tuvieron que adaptar las levaduras. A pesar de ello, las velocidades iniciales de fermentación de dicho mosto fueron mayores debido a los mayores niveles de nitrógeno fácilmente asimilable, hecho puesto de manifiesto en los ensayos de maceración pelicular y supraextracción.

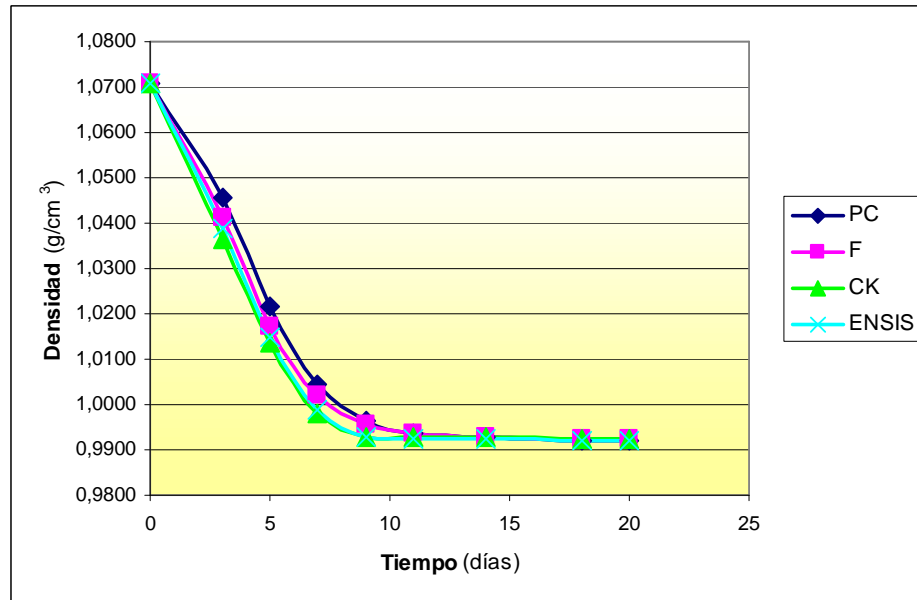


Fig. 54. Influencia de la cepa de levadura sobre la cinética fermentativa de mostos de uva *Palomino fino*

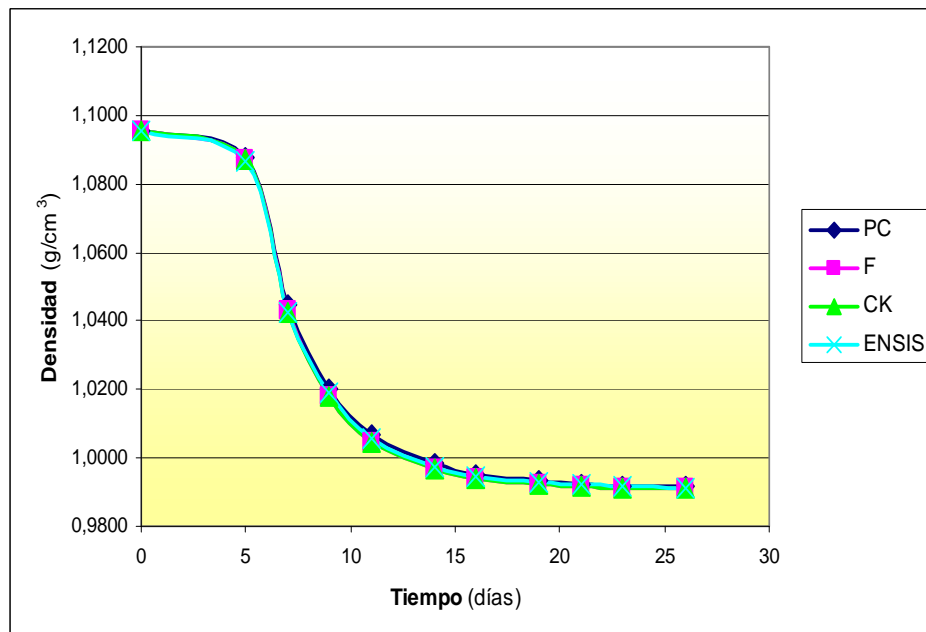


Fig. 55. Influencia de la cepa de levadura sobre la cinética fermentativa de mostos de uva *Moscatel de Alejandría*

V.3.2. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO

Tras las operaciones de clarificación y estabilización por frío de los vinos, se realizó un análisis general de los mismos para determinar la influencia de las distintas cepas de levadura sobre sus características finales.

Como se puede observar en las Tabla 38 y 39, para cada variedad, los vinos finales elaborados con las distintas cepas presentaron características analíticas muy similares encontrándose las mayores diferencias en el contenido mineral de Cu y Zn. Como se puede observar en dichas tablas, el contenido de ambos minerales presenta niveles más bajos para las cepas FERMIVIN y ENSIS-L5 alcanzando las primeras niveles de 2 a 10 veces inferiores a los del pie de cuba. Estas diferencias parecen indicar que las distintas cepas utilizadas en el estudio presentan distintas necesidades en micronutrientes, sobre todo de Cu y Zn. Numerosos autores confirman que las levaduras consumen determinados microelementos, entre ellos el Cu, durante su desarrollo y crecimiento (Rodríguez y col., 1999) y que dicho consumo depende de la cepa de levadura (Kirchman y Botta, 2007). Por otra parte, las cepas *Saccharomyces cerevisiae* también parecen actuar como bioacumuladores de iones (Kristl y col., 2003) adsorbiendo iones del medio en el que se encuentran (Han y col., 2006). Ambos fenómenos contribuirían a la disminución del Cu y Zn durante la fermentación a niveles que dependerían de la cepa utilizada y de sus necesidades nutritivas y/o capacidad adsorbente.

De todas las cepas estudiadas, la que presenta mejor comportamiento enológico es la CK con valores más elevados de acidez total y menores de acidez volátil para ambos tipos de vino, aunque su rendimiento alcohólico parece ser algo inferior.

Tabla 38. Análisis general de los vinos de *Palomino fino* elaborados con distintas cepas de levadura
(Media \pm DS)

| <i>Palomino fino</i> | | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | PC | F | CK | ENSIS |
| % v/v | 11,1 \pm 0,6 | 11,2 \pm 0,4 | 10,9 \pm 0,6 | 11,1 \pm 0,5 |
| Azúcares residuales | | | | |
| (g/L) | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 |
| Glicerina (g/L) | 6,37 \pm 0,52 | 6,36 \pm 0,10 | 6,31 \pm 0,22 | 6,31 \pm 0,30 |
| Acidez total | | | | |
| (g/L ác.tartárico) | 5,49 \pm 0,70 | 5,35 \pm 0,52 | 5,79 \pm 0,81 | 5,64 \pm 0,48 |
| Acidez volátil | | | | |
| (g/L ácido acético) | 0,330 \pm 0,065 | 0,350 \pm 0,110 | 0,157 \pm 0,015 | 0,251 \pm 0,030 |
| pH | 3,54 \pm 0,01 | 3,55 \pm 0,02 | 3,50 \pm 0,01 | 3,54 \pm 0,02 |
| Na (mg/L) | 67,8 \pm 0,8 | 62,0 \pm 0,3 | 64,0 \pm 0,4 | 63,7 \pm 0,4 |
| K (mg/L) | 516 \pm 1 | 508 \pm 1 | 566 \pm 2 | 545 \pm 2 |
| Fe (mg/L) | 2,03 \pm 0,80 | 1,90 \pm 0,50 | 2,81 \pm 0,75 | 2,03 \pm 0,60 |
| Mg (mg/L) | 61,6 \pm 1,5 | 61,3 \pm 1,3 | 61,0 \pm 0,8 | 63,6 \pm 1,7 |
| Ca (mg/L) | 89,3 \pm 1,5 | 87,0 \pm 1,9 | 91,1 \pm 1,9 | 89,1 \pm 2,7 |
| Cu (mg/L) | 3,50 \pm 0,13 | 0,79 \pm 0,05 | 2,83 \pm 0,16 | 1,60 \pm 0,10 |
| Zn (mg/L) | 1,40 \pm 0,30 | 0,65 \pm 0,15 | 1,67 \pm 0,35 | 0,83 \pm 0,29 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 39. Análisis general de los vinos de *Moscatel de Alejandría* elaborados con distintas cepas de levadura (Media \pm DS)

| <i>Moscatel de Alejandría</i> | | | | |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | PC | F | CK | ENSIS |
| % v/v | 12,4 \pm 0,4 | 13,0 \pm 0,1 | 12,7 \pm 0,6 | 12,6 \pm 0,4 |
| Azúcares residuales | | | | |
| (g/L) | 1,9 \pm 0,6 | 1,2 \pm 0,2 | < 0,5 | 1,5 \pm 0,3 |
| Glicerina (g/L) | 6,35 \pm 0,01 | 6,25 \pm 0,08 | 6,28 \pm 0,02 | 6,29 \pm 0,12 |
| Acidez total | | | | |
| (g/L ác.tartárico) | 5,09 \pm 0,77 | 5,42 \pm 0,79 | 5,49 \pm 0,62 | 5,49 \pm 0,45 |
| Acidez volátil | | | | |
| (g/L ácido acético) | 0,321 \pm 0,110 | 0,344 \pm 0,140 | 0,212 \pm 0,130 | 0,325 \pm 0,160 |
| pH | 3,40 \pm 0,03 | 3,55 \pm 0,01 | 3,54 \pm 0,01 | 3,54 \pm 0,01 |
| Na (mg/L) | 55,0 \pm 2,0 | 55,2 \pm 1,8 | 61,2 \pm 2,3 | 55,0 \pm 2,0 |
| K (mg/L) | 1135 \pm 128 | 1093 \pm 97 | 1162 \pm 109 | 1150 \pm 117 |
| Fe (mg/L) | 3,24 \pm 0,74 | 4,50 \pm 1,19 | 3,40 \pm 0,82 | 3,55 \pm 0,80 |
| Mg (mg/L) | 85,6 \pm 1,8 | 87,0 \pm 2,3 | 86,3 \pm 1,4 | 84,5 \pm 1,2 |
| Ca (mg/L) | 64,0 \pm 1,3 | 113,0 \pm 0,5 | 68,0 \pm 2,1 | 61,1 \pm 1,3 |
| Cu (mg/L) | 1,30 \pm 0,68 | 0,15 \pm 0,07 | 1,62 \pm 0,60 | 0,41 \pm 0,17 |
| Zn (mg/L) | 0,71 \pm 0,27 | 0,40 \pm 0,05 | 0,64 \pm 0,02 | 0,47 \pm 0,00 |

V.3.3. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO

Para evaluar si las cepas de levadura ejercían alguna influencia sobre las características cromáticas del vino, se determinaron las coordenadas CIELAB a^* , b^* , L^* y C^* y posteriormente se localizaron en el plano de coordenadas a^*b^* (Fig. 56) y L^*C^* (Fig. 57).

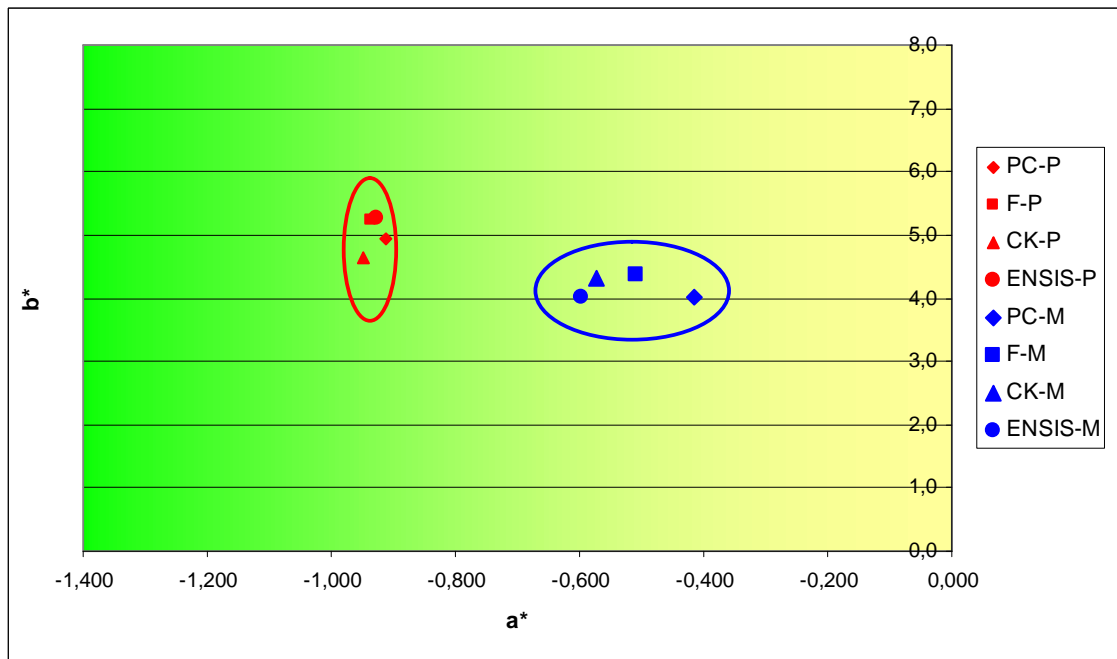


Fig. 56. Representación de los vinos *Palomino fino* (rojo) y *Moscatel de Alejandría* (azul) en el plano de color a^*b^* del espacio CIELAB

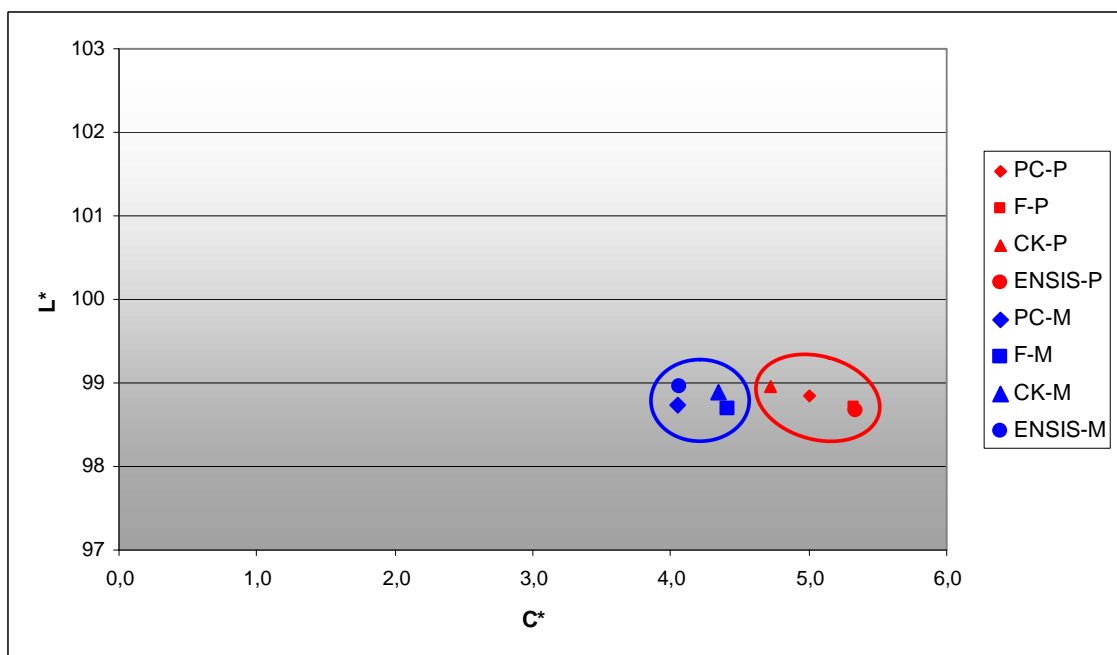


Fig. 57. Representación de los valores L^* de los vinos *Palomino fino* (rojo) y *Moscatel de Alejandría* (azul) frente a los valores C^* .

Como se puede observar en la Fig. 56, las mayores diferencias en el plano de color a^*b^* vienen dadas por el color propio de los vinos de cada variedad, no observándose diferencias significativas entre los vinos de las distintas cepas para cada una de las variedades, sobre todo en el caso de los vinos de *Palomino fino*. Así, los vinos de *Palomino* muestran un color más verdoso que los vinos de *Moscatel*, más amarillos.

Asimismo, tampoco se observan grandes diferencias en el plano de coordenadas L^*C^* (Fig. 57) en el que parece observarse que todos los vinos, independientemente de la variedad, presentan una luminosidad similar con valores entre 98,5-99, lo que indica gran intensidad de color. En cuanto a la intensidad cromática (C^*), las diferencias observadas son nuevamente debidas a la variedad de uva más que al tipo de levadura de fermentación, encontrándose los vinos de *Palomino* en el rango de 4,5-5,5 y los de *Moscatel* entre 4,0-4,5. Esto muestra que los vinos de *Palomino* presentan menos saturación de color que los de *Moscatel*.

V.3.4. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO

3.4.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios

En la Fig. 58 se presentan los niveles de metanol y alcoholes superiores producidos por las diferentes cepas de levaduras estudiadas en los vinos de la variedad *Palomino fino* (a) y *Moscatel de Alejandría* (b). Como se puede observar, nuevamente la materia prima (variedad de uva), y por tanto su composición, parece ser el factor que más influye en la producción de dichos compuestos por parte de la levadura.

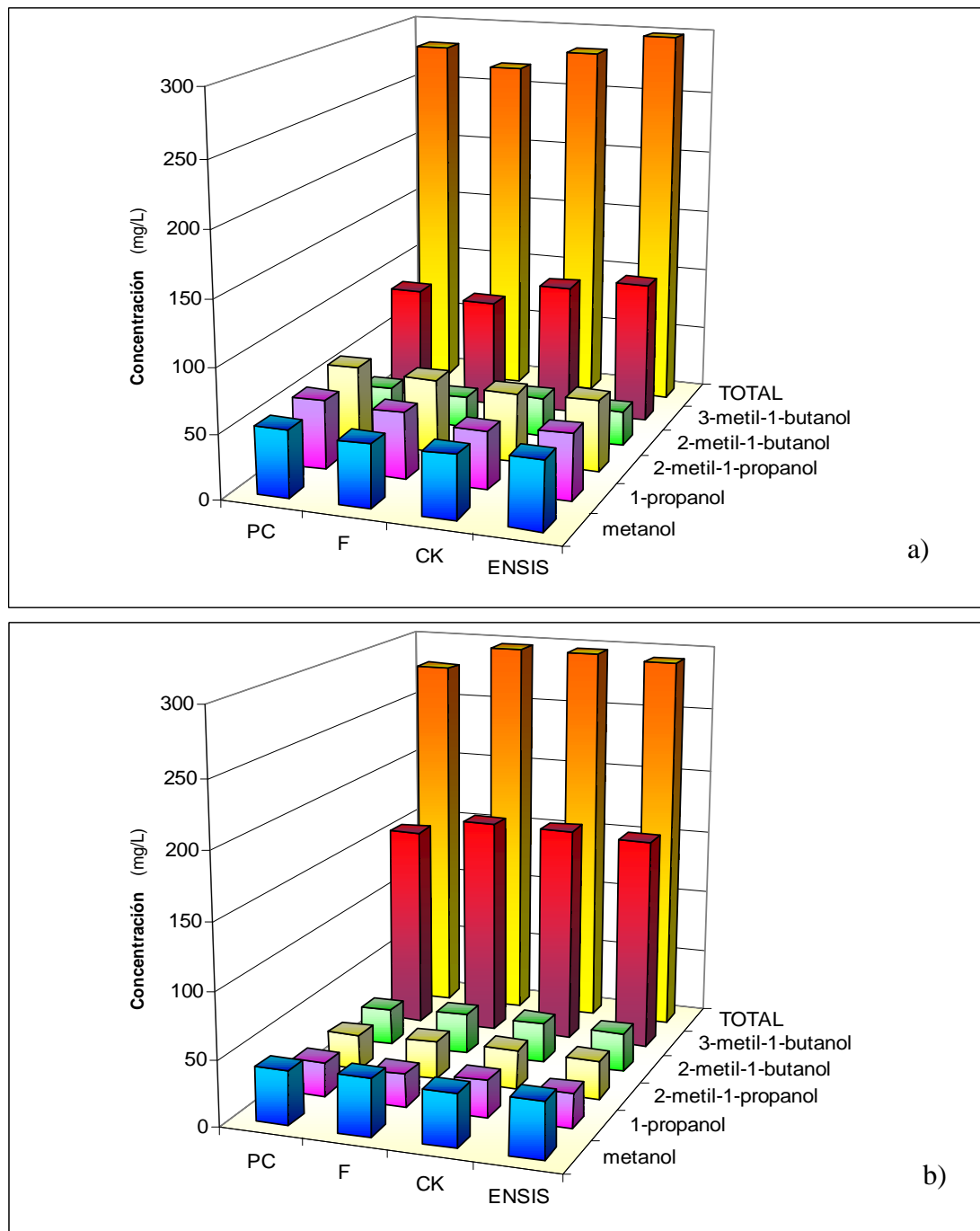


Fig. 58. Influencia de la cepa de levadura sobre la concentración de alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Palomino fino* (a) y *Moscatel de Alejandría* (b)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Así, mientras que el contenido en metanol es similar para ambos tipos de vino y para las distintas cepas estudiadas, en los vinos de *Palomino* (Fig. 58a) se observa un mayor distribución en la producción de alcoholes superiores destacando el 2-metil-1-propanol con niveles de 54-61 mg/L (el doble que en *Moscatel*) y el 3-metil-1-butanol con niveles comprendidos entre 85 y 112 mg/L. La relación entre los isoamílicos está, sin embargo, entre los valores normales (1/3 a 2/3) (Pérez, 1979). En el caso de los vinos de *Moscatel* (Fig. 58b), los resultados indican una mayor producción de 3-metil-1-butanol (del doble que en *Palomino*) y niveles inferiores del resto de alcoholes superiores, lo que hace que la relación entre alcoholes isoamílicos sea de 1/5, mucho más alta de lo esperado.

Atendiendo a las características de los vinos elaborados con las distintas cepas, aunque bajo las mismas condiciones la capacidad de producir alcoholes superiores es una característica general de las levaduras su cantidad va a depender de la cepa usada durante la fermentación (Riberéau-Gayón y col., 2000). Así, en el caso de los vinos de *Palomino fino*, la cepa ENSIS es la que produce mayores niveles de alcoholes superiores, sobre todo de 3-metil-1-butanol, y la FERMIVIN produce los niveles más bajos de alcoholes isoamílicos (2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol). La cepa PC, a pesar de los bajos niveles de isoamílicos, se sitúa por encima de la FERMIVIN debido a mayores niveles de 1-propanol y 2-metil-1-propanol. Salvo para la cepa ENSIS, en la que la relación entre los isoamílicos es de 1/4, entre las demás no se observan diferencias significativas encontrándose dicha relación en 1/3.

En el caso de los vinos de *Moscatel*, la cepa CK es la que presenta mayores niveles de los distintos alcoholes superiores dando lugar a una mayor producción total. La cepa PC, sin embargo, vuelve a presentar los niveles más bajos en alcoholes isoamílicos, lo que conduce a niveles más bajos del contenido total en alcoholes superiores. La relación entre los isoamílicos para las distintas cepas es en este caso 1/5, más elevada que en los vinos de *Palomino*.

En cuanto a los compuestos carbonilo, como se observa en las Tablas 40 y 41, la variedad de uva empleada en el proceso de vinificación va a tener también gran influencia

sobre el contenido de estos compuestos en el producto final. Así, en el caso de los vinos de *Palomino* los niveles de compuestos carbonilo son muy superiores a los de *Moscatel* (tanto de acetaldehído como de acetato de etilo), a excepción de los producidos con la cepa ENSIS, que presentan niveles similares para ambas variedades, sobre todo en acetato de etilo.

Tabla 40. Concentración de compuestos carbonilo (mg/L) en los vinos *Palomino fino* elaborados con distintas cepas de levadura

| COMPUESTOS CARBONILO (mg/L) | PC | F | CK | ENSIS |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Acetaldehído | 150,00 ± 1,10 | 80,00 ± 0,92 | 30,00 ± 0,53 | 34,00 ± 1,52 |
| Acetato etilo | 63,00 ± 1,50 | 50,00 ± 1,34 | 40,00 ± 1,71 | 26,00 ± 0,86 |
| Total compuestos carbonilo | 213,00 ± 1,50 | 130,00 ± 1,34 | 73,00 ± 1,71 | 60,00 ± 1,52 |

Tabla 41. Concentración de compuestos carbonilo (mg/L) en los vinos *Moscatel de Alejandría* elaborados con distintas cepas de levadura

| COMPUESTOS CARBONILO (mg/L) | PC | F | CK | ENSIS |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Acetaldehído | 81,00 ± 3,61 | 46,00 ± 1,56 | 23,00 ± 0,21 | 53,00 ± 2,26 |
| Acetato etilo | 19,00 ± 0,64 | 37,00 ± 1,20 | 17,00 ± 0,35 | 25,00 ± 0,85 |
| Total compuestos carbonilo | 100,00 ± 3,61 | 83,00 ± 1,56 | 40,00 ± 0,35 | 78,00 ± 2,26 |

Por otra parte, cabe destacar que la cepa CK es la que produce menos cantidades de acetaldehído y acetato de etilo y que la PC es la que conduce a mayores niveles de acetaldehído, sobre todo en los vinos de *Palomino* en los que se alcanzan los 150 mg/L. Este comportamiento tiene interés en la elaboración de vinos de Jerez, sobre todo los de crianza biológica, donde el acetaldehído constituye un parámetro de calidad de dichos vinos. Cabe recordar, que la cepa de levadura PC ha sido aislada y seleccionada por una bodega de la D.O. Bajo estos criterios y objetividad, la producción hacia vinos de mesa con esta cepa queda invalidada sin tener en cuenta el perfil en aromas minoritarios.

3.4.2. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios

Como se puede observar en las Tablas 42 y 43, de las cuatro cepas estudiadas, sólo la PC parece mostrar un comportamiento muy similar con independencia de la variedad de mosto empleado, siendo además la cepa que produce menor concentración en compuestos volátiles minoritarios totales debido principalmente a la menor producción de alcoholes, ácidos y ésteres. Este metabolismo característico de la cepa PC se ve aún más acentuado en los vinos de *Palomino*, cuyos mostos se caracterizan generalmente por su bajo contenido en aromas. En los vinos de *Moscatel* cabe resaltar la mayor producción de acetato de isoamilo y hexanoato de etilo por parte de esta cepa. Este atributo nuevamente se considera de interés para la orientación de la materia prima (vinos) hacia la producción de vinos generosos y dulces.

Atendiendo a los resultados obtenidos, las cepas F, CK y ENSIS muestran siempre mayor producción de aromas que la cepa PC. Sin embargo, en los vinos de *Palomino* (Tabla 42), cabe destacar la cepa CK mostrando las mayores concentraciones de ácido octanoico, 2-feniletanol, acetato de isoamilo, succinato de dietilo, 9-decenoato de etilo, palmitato de etilo y acetato de feniletilo, dando lugar a una mayor concentración de aromas totales.

En los de *Moscatel* (Tabla 43), se destacan los vinos elaborados con la cepa ENSIS mostrando niveles muy superiores de ácido octanoico, terpenos (linalool, α -terpineol, 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol), 2-feniletanol, 9-decenoato de etilo, pentanoato de etilo y acetato de feniletilo.

En todos los casos, la cepa F tiene un comportamiento intermedio con respecto a las demás cepas empleadas, de manera que siempre se sitúa en segundo lugar como mayor productora de aromas. Por tanto, esta cepa comercial da unos resultados muy homogéneos independientemente de la materia prima empleada. Tal y como recomienda la casa comercial,

dicha cepa podría emplearse para todo tipo de vinos resultando éstos con altas concentraciones de aromas.

Tabla 42. Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Palomino fino* elaborados con las distintas cepas de levaduras (Valores medios \pm DS)

| | PC | F | CK | ENSIS |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ACIDOS | | | | |
| Hexanoico | 85,58 \pm 31,20 | 134,04 \pm 15,85 | 155,04 \pm 26,41 | 135,63 \pm 15,67 |
| Decanoico | ns | 67,09 \pm 28,03 | 69,46 \pm 18,94 | 58,87 \pm 15,78 |
| Octanoico | 358,74 \pm 80,03 | 504,44 \pm 50,48 | 582,00 \pm 65,12 | 478,23 \pm 60,48 |
| 10-Undecenoico | ns | ns | ns | 46,58 \pm 19,89 |
| Total ácidos | 444,32 \pm 80,03 | 705,57 \pm 50,48 | 806,5 \pm 65,12 | 719,31 \pm 60,48 |
| p.100 total | 24,35 | 26,50 | 25,37 | 27,11 |
| TERPENOS | | | | |
| Citronelol | 6,57 \pm 0,36 | 12,43 \pm 0,69 | 13,24 \pm 0,80 | 10,14 \pm 0,64 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 9,05 \pm 0,51 | 13,04 \pm 0,24 | 10,49 \pm 0,50 | 8,59 \pm 0,20 |
| Total terpenos | 15,62 \pm 0,51 | 25,47 \pm 0,69 | 23,73 \pm 0,80 | 18,73 \pm 0,64 |
| p.100 total | 0,36 | 0,46 | 0,41 | 0,38 |
| ALCOHOLES | | | | |
| Isobutanol | 32,20 \pm 2,19 | 46,07 \pm 3,00 | 31,62 \pm 2,12 | 18,30 \pm 1,18 |
| 2-butil-1-octanol | 4,13 \pm 0,41 | 7,68 \pm 0,77 | 8,18 \pm 0,82 | 6,04 \pm 0,60 |
| Isohexanol | 0,44 \pm 0,03 | 4,62 \pm 0,23 | ns | 1,23 \pm 0,01 |
| 3-metil-1-pentanol | ns | ns | 2,43 \pm 0,03 | 3,35 \pm 0,06 |
| 1-hexanol | 96,28 \pm 3,20 | 132,35 \pm 5,00 | 121,97 \pm 4,98 | 94,75 \pm 2,83 |
| trans-3-hexen-1-ol | 0,13 \pm 0,01 | 0,43 \pm 0,04 | 0,52 \pm 0,02 | 0,40 \pm 0,01 |
| 3-etoxi-1-propanol | 4,82 \pm 0,30 | 7,88 \pm 0,38 | 3,78 \pm 0,24 | 6,10 \pm 0,40 |
| cis-3-hexen-1-ol | 3,68 \pm 0,06 | 6,20 \pm 0,10 | 5,57 \pm 0,08 | 4,37 \pm 0,10 |
| 2,3-butanodiol | 5,01 \pm 0,53 | 5,70 \pm 0,50 | ns | ns |
| 3-etil-2-pentanol | 1,56 \pm 0,41 | ns | 4,79 \pm 0,16 | 4,09 \pm 0,48 |
| Alcohol bencílico | 14,25 \pm 0,97 | 19,44 \pm 0,76 | 7,56 \pm 0,15 | 9,68 \pm 0,19 |
| Alcohol feniletilo | 955,23 \pm 3,59 | 1249,95 \pm 22,37 | 1573,88 \pm 35,62 | 1192,92 \pm 23,44 |
| Total alcoholes | 1117,73 \pm 3,59 | 1480,32 \pm 22,37 | 1760,30 \pm 35,92 | 1341,24 \pm 23,44 |
| p.100 total | 62,60 | 55,07 | 54,40 | 50,56 |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | |
| 2,6-diterbutil-4-etilfenol | 5,30 \pm 0,12 | 10,91 \pm 0,11 | 15,02 \pm 0,03 | 8,58 \pm 0,63 |
| Total fenoles | 5,30 \pm 0,12 | 10,91 \pm 0,11 | 15,02 \pm 0,03 | 8,58 \pm 0,63 |
| p.100 total | 0,29 | 0,40 | 0,46 | 0,32 |

ns: no se detecta

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 42 (continuación). Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Palomino fino* elaborados con las distintas cepas de levaduras (Valores medios \pm DS)

| | PC | F | CK | ENSIS |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ÉSTERES | | | | |
| Acetato de isobutilo | 0,35 \pm 0,01 | ns | ns | 0,09 \pm 0,15 |
| Butirato de etilo | ns | 1,21 \pm 0,67 | 1,03 \pm 0,03 | 0,63 \pm 0,02 |
| Isovalerato de etilo | 1,14 \pm 0,17 | 2,09 \pm 0,15 | 1,89 \pm 0,31 | 0,98 \pm 0,28 |
| Acetato de isoamilo | 4,01 \pm 2,09 | 6,47 \pm 1,89 | 9,58 \pm 2,84 | 4,75 \pm 3,04 |
| Hexanoato de etilo | 6,67 \pm 1,72 | 14,89 \pm 0,94 | 14,42 \pm 1,39 | 9,98 \pm 2,18 |
| Lactato de etilo | 8,67 \pm 0,50 | 15,77 \pm 0,93 | 13,87 \pm 1,04 | 7,81 \pm 0,94 |
| Octanoato de etilo | 31,30 \pm 12,63 | 51,64 \pm 9,46 | 49,94 \pm 11,86 | 51,26 \pm 21,20 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 3,92 \pm 0,57 | 6,59 \pm 0,57 | 8,71 \pm 0,22 | 11,62 \pm 0,07 |
| Decanoato de etilo | 52,77 \pm 4,85 | 83,59 \pm 0,15 | 72,10 \pm 1,62 | 87,42 \pm 0,57 |
| Succinato de dietilo | 11,77 \pm 0,72 | 25,66 \pm 1,69 | 35,57 \pm 1,29 | 32,63 \pm 0,60 |
| 9-Decenoato de etilo | 9,95 \pm 5,75 | 15,61 \pm 2,90 | 41,74 \pm 6,88 | 21,41 \pm 5,10 |
| Pentanoato de etilo | 39,23 \pm 5,56 | 98,32 \pm 11,27 | 53,44 \pm 2,69 | 59,99 \pm 0,94 |
| Palmitato de etilo | ns | 51,05 \pm 2,50 | 139,40 \pm 19,52 | 45,65 \pm 6,39 |
| Acetato de feniletilo | 38,25 \pm 8,67 | 57,64 \pm 2,85 | 97,22 \pm 9,18 | 76,71 \pm 5,80 |
| Laurato de etilo | ns | ns | 23,22 \pm 3,13 | 49,40 \pm 6,67 |
| Nonadecanoato de etilo | 4,55 \pm 0,61 | 25,00 \pm 3,37 | ns | ns |
| 2-hidroxi-4-metilpentanoato de etilo | 12,38 \pm 1,67 | 16,85 \pm 2,27 | 20,28 \pm 2,74 | 13,80 \pm 1,86 |
| Linoleato de etilo | ns | ns | 49,45 \pm 6,67 | 70,57 \pm 9,53 |
| Total ésteres | 225,03 \pm 12,63 | 472,39 \pm 11,27 | 631,90 \pm 19,52 | 544,68 \pm 21,20 |
| p.100 total | 12,69 | 17,97 | 19,82 | 21,95 |
| TIOLES | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 2,13 \pm 0,27 | 5,13 \pm 0,21 | 8,63 \pm 0,10 | 6,13 \pm 0,22 |
| Total tioles | 2,13 \pm 0,27 | 5,13 \pm 0,21 | 8,63 \pm 0,10 | 6,13 \pm 0,22 |
| p.100 total | 0,12 | 0,19 | 0,27 | 0,23 |
| TOTAL AROMAS | 1810,12 \pm 80,03 | 2699,79 \pm 50,48 | 3246,09 \pm 65,12 | 2638,67 \pm 60,48 |

ns: no se detecta

Tabla 43. Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Moscatel de Alejandría* elaborados con las distintas cepas de levaduras (Valores medios \pm DS)

| | PC | F | CK | ENSIS |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ACIDOS | | | | |
| Isovalérico | 11,13 \pm 0,04 | 16,17 \pm 0,14 | 14,70 \pm 0,37 | 13,24 \pm 0,13 |
| Hexanoico | 463,76 \pm 10,30 | 479,54 \pm 6,34 | 466,17 \pm 6,52 | 467,96 \pm 3,62 |
| Decanoico | ns | 371,72 \pm 2,04 | 276,89 \pm 7,77 | 332,62 \pm 2,60 |
| Octanoico | 1462,40 \pm 28,15 | 1479,32 \pm 26,70 | 1468,45 \pm 29,45 | 1586,83 \pm 20,76 |
| 10-Undecenoico | ns | 546,38 \pm 1,64 | 406,75 \pm 4,04 | 516,84 \pm 2,52 |
| Total ácidos | 1937,29 \pm 28,15 | 2893,12 \pm 26,70 | 2632,96 \pm 29,45 | 2917,49 \pm 20,76 |
| p.100 total | 37,91 | 43,83 | 41,24 | 42,36 |
| TERPENOS | | | | |
| Linalool | 86,76 \pm 1,80 | 89,85 \pm 1,94 | 95,81 \pm 2,28 | 96,73 \pm 2,39 |
| α -terpineol | 55,18 \pm 0,93 | 59,55 \pm 1,08 | 62,74 \pm 1,27 | 61,29 \pm 1,21 |
| Citronelol | 17,80 \pm 0,15 | 17,93 \pm 0,09 | 20,54 \pm 0,14 | 19,65 \pm 0,15 |
| Geraniol | 13,41 \pm 0,28 | 14,00 \pm 0,29 | 15,14 \pm 0,32 | 15,23 \pm 0,32 |
| Nerol | 6,60 \pm 0,14 | 8,06 \pm 0,17 | 7,45 \pm 0,16 | 7,71 \pm 0,16 |
| trans-óxido de linalol | 2,68 \pm 0,06 | 2,77 \pm 0,09 | 2,58 \pm 0,05 | 2,40 \pm 0,06 |
| cis-óxido de linalol | 6,21 \pm 0,13 | 4,95 \pm 0,02 | 5,61 \pm 0,09 | 5,29 \pm 0,03 |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | 8,02 \pm 0,30 | 8,95 \pm 0,37 | 11,68 \pm 0,54 | 10,61 \pm 0,47 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 343,27 \pm 0,08 | 344,50 \pm 1,59 | 382,92 \pm 1,94 | 401,73 \pm 3,37 |
| 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol | 31,73 \pm 0,05 | 29,45 \pm 0,55 | 28,45 \pm 1,01 | 29,46 \pm 1,99 |
| Total terpenos | 571,66 \pm 1,80 | 580,00 \pm 1,94 | 632,92 \pm 2,28 | 650,09 \pm 3,37 |
| p.100 total | 11,19 | 8,79 | 9,91 | 9,44 |
| ALCOHOLES | | | | |
| Isobutanol | 3,43 \pm 0,06 | 3,52 \pm 0,05 | 3,20 \pm 0,00 | 3,27 \pm 0,01 |
| 1-pentanol | 0,30 \pm 0,00 | 0,37 \pm 0,01 | ns | 0,29 \pm 0,00 |
| Isohexanol | 5,08 \pm 0,23 | 6,09 \pm 0,32 | 5,52 \pm 0,28 | 4,92 \pm 0,17 |
| 3-metil-1-pentanol | 14,42 \pm 0,56 | 14,10 \pm 0,55 | 13,50 \pm 0,60 | 13,51 \pm 0,40 |
| 1-hexanol | 24,57 \pm 0,98 | 26,13 \pm 0,63 | 27,10 \pm 0,42 | 25,10 \pm 0,83 |
| trans-3-hexen-1-ol | 0,17 \pm 0,22 | 1,64 \pm 0,08 | 1,46 \pm 0,04 | 1,49 \pm 0,08 |
| 3-etoxi-1-propanol | 0,80 \pm 0,01 | 0,82 \pm 0,00 | 0,68 \pm 0,02 | 0,61 \pm 0,02 |
| cis-3-hexen-1-ol | 12,18 \pm 0,25 | 13,39 \pm 0,05 | 12,80 \pm 0,24 | 12,75 \pm 0,26 |
| Alcohol feniletilo | 1723,45 \pm 30,08 | 1985,68 \pm 33,20 | 2031,19 \pm 16,03 | 2149,26 \pm 9,33 |
| Total alcoholes | 1784,40 \pm 30,08 | 2051,73 \pm 33,20 | 2095,45 \pm 16,03 | 2211,19 \pm 9,33 |
| p.100 total | 34,92 | 31,08 | 32,82 | 32,10 |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | |
| Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-piran-3-ol | 38,83 \pm 0,15 | 43,27 \pm 0,36 | 42,03 \pm 0,12 | 45,46 \pm 0,45 |
| Total fenoles | 38,83 \pm 0,15 | 43,27 \pm 0,36 | 42,03 \pm 0,12 | 45,46 \pm 0,45 |
| p.100 total | 0,76 | 0,65 | 0,66 | 0,66 |

ns: no se detecta

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 43 (continuación). Concentración de aromas ($\mu\text{g/L}$) de los vinos *Moscatel de Alejandría* elaborados con las distintas cepas de levaduras (Valores medios \pm DS)

| | PC | F | CK | ENSIS |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ÉSTERES | | | | |
| Butirato de etilo | 0,82 \pm 0,12 | 0,66 \pm 0,11 | 0,68 \pm 0,12 | 0,52 \pm 0,14 |
| Acetato de isoamilo | 71,82 \pm 6,42 | 51,92 \pm 7,34 | 49,74 \pm 0,75 | 36,89 \pm 2,22 |
| Hexanoato de etilo | 32,81 \pm 3,38 | 23,57 \pm 2,81 | 22,32 \pm 2,43 | 17,39 \pm 2,92 |
| Acetato de hexilo | 2,53 \pm 0,24 | 1,82 \pm 0,32 | 1,86 \pm 0,50 | 1,29 \pm 0,59 |
| Acetato de cis-hexenol | 2,14 \pm 0,11 | 1,93 \pm 0,14 | 1,75 \pm 0,07 | 1,44 \pm 0,27 |
| Lactato de etilo | 1,63 \pm 0,07 | 1,96 \pm 0,09 | 0,65 \pm 0,01 | 1,66 \pm 0,07 |
| Octanoato de etilo | 131,27 \pm 2,32 | 130,94 \pm 2,36 | 120,02 \pm 1,83 | 113,76 \pm 1,51 |
| Decanoato de etilo | 52,91 \pm 2,35 | 60,13 \pm 2,27 | 53,98 \pm 2,15 | 54,02 \pm 1,78 |
| Succinato de dietilo | 29,43 \pm 1,17 | 32,82 \pm 0,92 | 37,11 \pm 1,94 | 37,17 \pm 1,94 |
| 9-Decenoato de etilo | 121,21 \pm 16,32 | 138,67 \pm 6,45 | 124,79 \pm 11,50 | 159,07 \pm 10,99 |
| Pentanoato de etilo | 153,31 \pm 2,07 | 179,42 \pm 2,42 | 170,48 \pm 2,60 | 181,37 \pm 2,45 |
| Palmitato de etilo | 3,19 \pm 0,38 | 0,96 \pm 0,14 | ns | ns |
| Acetato de feniletilo | 370,05 \pm 7,66 | 401,75 \pm 6,61 | 393,03 \pm 6,88 | 454,20 \pm 5,10 |
| Total ésteres | 973,11 \pm 16,32 | 1026,54 \pm 7,34 | 976,42 \pm 11,50 | 1058,77 \pm 10,99 |
| p.100 total | 19,04 | 15,55 | 15,29 | 15,37 |
| TIOLES | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 4,41 \pm 0,06 | 6,01 \pm 0,12 | 5,07 \pm 0,12 | 4,99 \pm 0,15 |
| Total tioles | 4,41 \pm 0,06 | 6,01 \pm 0,12 | 5,07 \pm 0,12 | 4,99 \pm 0,15 |
| p.100 total | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,07 |
| TOTAL AROMAS | 5109,70 \pm 30,08 | 6600,67 \pm 33,20 | 6384,85 \pm 16,03 | 6887,99 \pm 10,99 |

ns: no se detecta

Por otra parte, es importante resaltar que, tanto en los vinos de *Palomino* como en los de *Moscatel*, las cepas CK y ENSIS, mostraron una mayor síntesis o liberación de compuestos terpénicos. Lo cual confirma los resultados obtenidos por otros autores (King y Dickinson, 2000; Fernández-González y col, 2003; Moruno y col., 2002) sobre la capacidad de las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de hidrolizar y producir terpenoles y su influencia sobre el contenido total en vinos.

El hecho de que las distintas cepas muestren una mayor o menor producción de aromas y de que la producción de los distintos metabolitos esté influenciada por el medio de fermentación condiciona, por tanto, el empleo de una cepa u otra a la hora de obtener vinos más o menos aromáticos. Así, atendiendo a estos resultados, para obtener vinos aromáticos a

partir de mostos de variedades neutras o poco aromáticas, es más adecuado el empleo de cepas de levadura comerciales productoras de aromas como la CK (cepa varietal expresamente seleccionada para la elaboración de vinos aromáticos). Sin embargo, si la variedad es muy aromática, como el caso de la *Moscatel*, las cepas que conducen a mejores resultados desde el punto de vista de mayor concentración de aromas son las cepas como la ENSIS que, según la casa comercial, respetan la tipicidad varietal.

3.4.3. Influencia sobre el valor de aroma

En las Tablas 44 y 45 se recogen los VAOs de cada componente para los vinos procedentes de las distintas fermentaciones. Atendiendo a dichas Tablas y considerando sólo los VAOs > 1 , sólo el ácido octanoico, los ésteres hexanoato, octanoato y pentanoato de etilo, los alcoholes superiores (a excepción del propanol) y los compuestos carbonilo (acetaldehído y acetato de etilo) son los que más contribuyen al perfil aromático general de los vinos.

En los vinos de *Moscatel*, mostraron también una contribución importante al aroma los compuestos terpénicos linalol, cis-óxido de linalol y el hotrienol (3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol) y el acetato de isoamilo.

Para ambas variedades, la serie afrutada (A) mostró los valores de aroma más altos debido a la alta contribución de los ésteres y, en particular por el pentanoato de etilo (aroma a manzana). En los vinos de *Moscatel*, también fue importante la contribución de la serie floral (F) representada principalmente por los compuestos terpénicos, y particularmente por el linalol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 44. Influencia de las cepas de levadura sobre el perfil aromático de los vinos *Palomino fino*
(Valores medios \pm DS)

| | PC | F | CK | ENSIS | |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----|
| ACIDOS | | | | | |
| Hexanoico | 0,204 \pm 0,070 | 0,319 \pm 0,038 | 0,369 \pm 0,063 | 0,323 \pm 0,037 | H |
| Decanoico | - | 0,067 \pm 0,028 | 0,069 \pm 0,019 | 0,059 \pm 0,016 | DO |
| Octanoico | 0,717 \pm 0,160 | 1,009 \pm 0,101 | 1,164 \pm 0,130 | 0,956 \pm 0,121 | L |
| TERPENOS | | | | | |
| Citronelol | 0,066 \pm 0,004 | 0,124 \pm 0,007 | 0,132 \pm 0,008 | 0,101 \pm 0,006 | F |
| ALCOHOLES | | | | | |
| 1-hexanol | 0,088 \pm 0,003 | 0,120 \pm 0,005 | 0,111 \pm 0,005 | 0,086 \pm 0,003 | H |
| cis-3-hexen-1-ol | 0,009 \pm 0,000 | 0,015 \pm 0,000 | 0,014 \pm 0,000 | 0,011 \pm 0,000 | H |
| Alcohol bencílico | 0,016 \pm 0,001 | 0,022 \pm 0,001 | 0,008 \pm 0,000 | 0,011 \pm 0,000 | F |
| Alcohol feniletilo | 0,096 \pm 0,000 | 0,125 \pm 0,002 | 0,157 \pm 0,003 | 0,119 \pm 0,002 | F |
| ÉSTERES | | | | | |
| Butirato de etilo | - | 0,060 \pm 0,033 | 0,052 \pm 0,002 | 0,031 \pm 0,001 | A |
| Isovalerato de etilo | 0,381 \pm 0,057 | 0,696 \pm 0,050 | 0,631 \pm 0,103 | 0,326 \pm 0,093 | A |
| Acetato de isoamilo | 0,137 \pm 0,070 | 0,216 \pm 0,063 | 0,319 \pm 0,094 | 0,158 \pm 0,101 | A |
| Hexanoato de etilo | 1,335 \pm 0,344 | 2,979 \pm 0,188 | 2,884 \pm 0,278 | 1,996 \pm 0,436 | A |
| Octanoato de etilo | 6,259 \pm 2,526 | 10,329 \pm 1,892 | 9,988 \pm 2,372 | 10,251 \pm 4,240 | A |
| Decanoato de etilo | 0,264 \pm 0,024 | 0,418 \pm 0,001 | 0,361 \pm 0,008 | 0,437 \pm 0,003 | A |
| Succinato de dietilo | 0,010 \pm 0,001 | 0,021 \pm 0,014 | 0,030 \pm 0,001 | 0,027 \pm 0,001 | A |
| Pentanoato de etilo | 26,152 \pm 2,78 | 65,55 \pm 5,635 | 35,624 \pm 1,345 | 39,99 \pm 0,470 | A |
| Acetato de feniletilo | 0,153 \pm 0,035 | 0,231 \pm 0,011 | 0,389 \pm 0,037 | 0,307 \pm 0,023 | F |
| Laurato de etilo | - | - | 0,232 \pm 0,031 | 0,494 \pm 0,007 | H |
| ALCOHOLES SUPERIORES | | | | | |
| 1-propanol | 0,176 \pm 0,003 | 0,170 \pm 0,003 | 0,147 \pm 0,004 | 0,167 \pm 0,004 | O |
| 2-metil-1-propanol | 2,033 \pm 0,025 | 1,933 \pm 0,019 | 1,800 \pm 0,023 | 1,867 \pm 0,023 | O |
| 2-metil-1-butanol | 0,833 \pm 0,007 | 0,800 \pm 0,003 | 1,033 \pm 0,017 | 0,900 \pm 0,010 | O |
| 3-metil-1-butanol | 2,967 \pm 0,015 | 2,833 \pm 0,033 | 3,467 \pm 0,040 | 3,733 \pm 0,026 | O |
| COMPUESTOS CARBONILO | | | | | |
| Acetaldehído | 15,00 \pm 0,110 | 8,000 \pm 0,092 | 3,000 \pm 0,053 | 3,400 \pm 0,152 | O |
| Acetato etilo | 5,250 \pm 0,125 | 4,167 \pm 0,112 | 3,333 \pm 0,142 | 2,167 \pm 0,072 | O |

Tabla 45. Influencia de las cepas de levadura sobre el perfil aromático de los vinos *Moscatel de Alejandría*
(Valores medios \pm DS)

| | PC | F | CK | ENSIS | |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----|
| ACIDOS | | | | | |
| Isovalérico | 0,337 \pm 0,001 | 0,490 \pm 0,004 | 0,445 \pm 0,011 | 0,401 \pm 0,004 | L |
| Hexanoico | 1,104 \pm 0,024 | 1,142 \pm 0,015 | 1,110 \pm 0,015 | 1,114 \pm 0,008 | H |
| Decanoico | - | 0,372 \pm 0,002 | 0,277 \pm 0,008 | 0,333 \pm 0,003 | L |
| Octanoico | 2,925 \pm 0,056 | 2,959 \pm 0,053 | 2,937 \pm 0,059 | 3,174 \pm 0,041 | DO |
| TERPENOS | | | | | |
| Linalool | 5,784 \pm 0,120 | 5,990 \pm 0,129 | 6,387 \pm 0,152 | 6,448 \pm 0,159 | F |
| a-terpineol | 0,221 \pm 0,004 | 0,238 \pm 0,004 | 0,251 \pm 0,005 | 0,245 \pm 0,005 | F |
| Citronelol | 0,178 \pm 0,002 | 0,179 \pm 0,001 | 0,205 \pm 0,001 | 0,196 \pm 0,002 | F |
| Geraniol | 0,027 \pm 0,001 | 0,028 \pm 0,001 | 0,030 \pm 0,001 | 0,030 \pm 0,001 | F |
| Nerol | 0,220 \pm 0,005 | 0,269 \pm 0,005 | 0,248 \pm 0,005 | 0,257 \pm 0,005 | F |
| trans-óxido de linalol | 0,024 \pm 0,001 | 0,025 \pm 0,002 | 0,023 \pm 0,001 | 0,022 \pm 0,001 | F |
| cis-óxido de linalol | 1,034 \pm 0,022 | 0,824 \pm 0,003 | 0,934 \pm 0,015 | 0,882 \pm 0,005 | F |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | 1,337 \pm 0,003 | 1,492 \pm 0,004 | 1,947 \pm 0,005 | 1,768 \pm 0,005 | F |
| ALCOHOLES | | | | | |
| 1-hexanol | 0,022 \pm 0,001 | 0,024 \pm 0,001 | 0,025 \pm 0,000 | 0,023 \pm 0,001 | H |
| cis-3-hexen-1-ol | 0,030 \pm 0,001 | 0,033 \pm 0,000 | 0,032 \pm 0,001 | 0,032 \pm 0,001 | H |
| Alcohol feniletilo | 0,172 \pm 0,003 | 0,199 \pm 0,003 | 0,203 \pm 0,002 | 0,215 \pm 0,001 | F |
| ÉSTERES | | | | | |
| Butirato de etilo | 0,041 \pm 0,006 | 0,033 \pm 0,006 | 0,034 \pm 0,006 | 0,026 \pm 0,007 | A |
| Acetato de isoamilo | 2,394 \pm 0,214 | 1,731 \pm 0,245 | 1,658 \pm 0,025 | 1,230 \pm 0,074 | A |
| Hexanoato de etilo | 6,562 \pm 0,676 | 4,714 \pm 0,562 | 4,465 \pm 0,486 | 3,477 \pm 0,444 | A |
| Octanoato de etilo | 26,255 \pm 0,464 | 26,189 \pm 0,472 | 24,003 \pm 0,276 | 22,753 \pm 0,302 | A |
| Decanoato de etilo | 0,265 \pm 0,012 | 0,301 \pm 0,011 | 0,270 \pm 0,011 | 0,270 \pm 0,009 | A |
| Succinato de dietilo | 0,025 \pm 0,001 | 0,027 \pm 0,001 | 0,031 \pm 0,001 | 0,031 \pm 0,001 | A |
| Pentanoato de etilo | 102,206 \pm 1,035 | 119,614 \pm 1,210 | 113,653 \pm 1,300 | 120,911 \pm 1,225 | A |
| Acetato de feniletilo | 1,480 \pm 0,031 | 1,607 \pm 0,026 | 1,572 \pm 0,027 | 1,817 \pm 0,020 | F |
| ALCOHOLES SUPERIORES | | | | | |
| 1-propanol | 0,085 \pm 0,001 | 0,082 \pm 0,000 | 0,092 \pm 0,001 | 0,085 \pm 0,001 | O |
| 2-metil-1-propanol | 0,900 \pm 0,002 | 0,967 \pm 0,005 | 1,000 \pm 0,012 | 0,967 \pm 0,007 | O |
| 2-metil-1-butanol | 0,933 \pm 0,002 | 1,033 \pm 0,002 | 1,033 \pm 0,005 | 1,000 \pm 0,016 | O |
| 3-metil-1-butanol | 5,200 \pm 0,038 | 5,600 \pm 0,052 | 5,567 \pm 0,005 | 5,467 \pm 0,045 | O |
| COMPUESTOS CARBONILO | | | | | |
| Acetaldehído | 8,100 \pm 0,361 | 4,600 \pm 0,156 | 2,300 \pm 0,021 | 5,300 \pm 0,226 | O |
| Acetato etilo | 1,583 \pm 0,053 | 3,083 \pm 0,100 | 1,417 \pm 0,029 | 2,083 \pm 0,071 | O |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque en el apartado anterior, las cepas CK y ENSIS mostraron una mayor producción de aromas minoritarios, la cepa F presentó mayor importancia dada la contribución de sus ésteres a la serie afrutada de los vinos, sobre todo debido a la aportación del pentanoato de etilo.

El aporte de los aromas florales tuvo mayor importancia en la variedad *Moscatel* dado su alto contenido en terpenos. Los compuestos aromáticos que mayor valor de aroma aportaron a esta serie fueron el linalol y el acetato de feniletilo destacando aún más en los vinos producidos con la cepa ENSIS.

La aportación de las demás series (otros, herbáceas, láctea y de oxidación) no fue de gran importancia puesto que los valores de aroma de los componentes de cada serie estuvieron por debajo de uno. En el caso de las series herbáceas y de oxidación, dichos valores fueron muy similares para las distintas cepas empleadas.

La cepa PC presentó el menor contenido en aromas y también en general, la menor contribución de las distintas series al perfil aromático de los vinos. Destacó por la aportación de acetaldehído (serie “otros”), que se caracteriza por un olor considerado como negativo por algunos autores por dar características de oxidación. En el caso de los vinos sometidos a crianza biológica, sin embargo, dicho compuesto adquiere gran importancia proporcionando a los mismos un aroma característico que recuerda a almendra amarga.

En general, los vinos elaborados con la cepa FERMIVIN presentaron aromas con mayor aportación del afrutado (aroma a manzana, piña y pera) independientemente de la variedad de uva empleada, sin embargo, la variedad influye considerablemente en la contribución de los aromas florales producidos principalmente por los compuestos terpénicos. Aunque el 2-feniletanol contribuye también a la serie floral, en este caso su contribución fue muy baja.

V.3.5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO

En la Fig. 59 se recogen los resultados obtenidos tras la valoración sensorial de los distintos vinos. En dicha figura se puede observar la influencia de la cepa de levadura usada durante la fermentación en las características sensoriales del vino, principalmente sobre la intensidad y calidad de aroma.

Entre los vinos de la variedad *Palomino* (Fig. 59a), el mejor valorado fue el elaborado con la cepa FERMIVIN resaltando sobre todo por su intensidad aromática con notas afrutadas y especiedas. Por otra parte, dichos vinos presentaron también la menor intensidad de color. Los vinos elaborados con CK y ENSIS mostraron también diferencias significativas con respecto al testigo, principalmente en intensidad y calidad de aroma ($p < 0,01$ y $0,001$ respectivamente).

Para los vinos de *Moscatel* (Fig. 59b), los mejores resultados se obtuvieron con la cepa ENSIS. Los vinos elaborados con dicha cepa se diferenciaron significativamente del testigo en intensidad y calidad de aroma y suavidad.

Los vinos testigo, obtenidos con la cepa PC, mostraron características aromáticas muy similares. De hecho, el panel de catadores los evaluó como vinos “ajerezados” debido principalmente a su aroma a frutos secos, almendra, característico de los vinos de jerez elaborados bajo velo de flor. Este resultado confirma lo obtenido en el análisis del valor de aroma y el hecho de que la cepa de levadura PC sea una cepa seleccionada para la fermentación de vinos de *Palomino* y posterior crianza bajo velo.

En todos los casos, los resultados confirman las observaciones realizadas en el estudio del perfil aromático de los vinos a partir de sus valores de aroma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

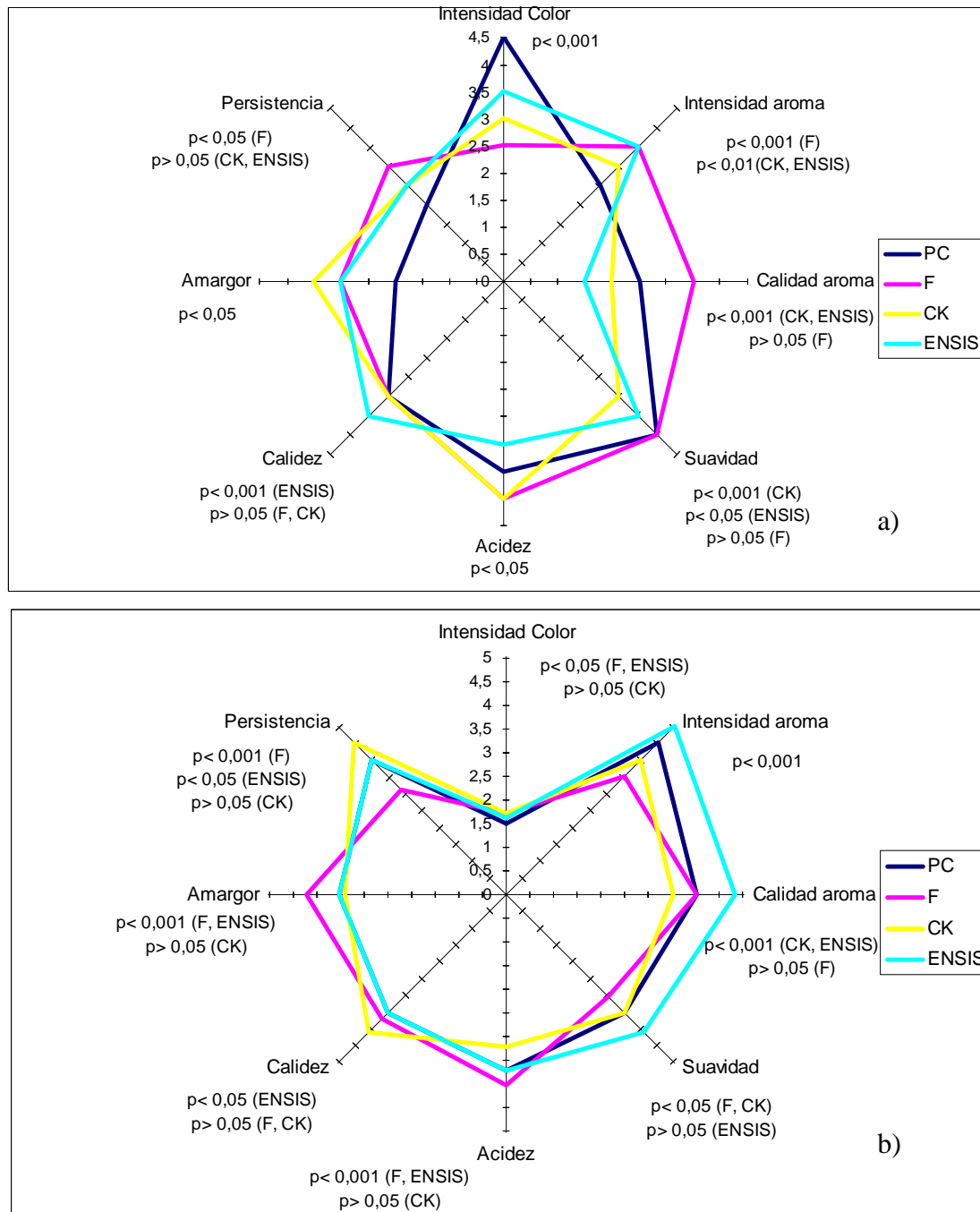


Fig. 59. Análisis sensorial comparativo entre los vinos elaborados con las distintas cepas de levadura a partir de las variedades *Palomino fino* (a) y *Moscatel de Alejandría* (b)

V.4. EMPLEO DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES PARA LA MEJORA AROMÁTICA DE LOS VINOS *Palomino fino* Y *Moscatel de Alejandría*

Una vez clarificados los vinos, elaborados con las distintas cepas, y retiradas las lías, cada uno de ellos se dividió en fracciones a las que se les adicionó un preparado enzimático comercial. Para estos ensayos se utilizaron dos preparados comerciales caracterizados por su alta actividad β -glucosidasa y recomendados para la liberación de aromas tras el proceso de fermentación (Novoferm 12G y Rapidase AR-2000), principalmente para la liberación de terpenoles y norisoprenoides. Las dosis empleadas en cada caso fueron las recomendadas por las casas comerciales Novo Nordisk y DSM Food Specialties, respectivamente. Tras dos semanas de la adición de los extractos se adicionó bentonita a dosis de 40 g/hL para finalizar dicha actividad y se pasó al filtrado y embotellado de los vinos.

V.4.1. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VINO

Como se puede observar en las Tablas 46 y 47 los distintos extractos enzimáticos no ejercen influencia alguna sobre los parámetros analíticos de los vinos de *Palomino* y *Moscatel*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 46. Análisis general de los vinos de *Palomino fino* antes y después del tratamiento con enzimas
(Media \pm DS)

| <i>Palomino fino</i> | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | PC | PC 12G | PC AR | F | F 12G | F AR | CK | CK 12G | CK AR | ENSIS | ENSIS 12G | ENSIS AR |
| % v/v | 11,1 \pm 0,6 | 10,1 \pm 0,5 | 10,6 \pm 0,6 | 11,2 \pm 0,4 | 10,1 \pm 0,6 | 11,2 \pm 0,5 | 10,9 \pm 0,6 | 10,6 \pm 0,3 | 10,9 \pm 0,5 | 11,1 \pm 0,5 | 10,6 \pm 0,7 | 10,8 \pm 0,3 |
| A. R. (g/L) | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 | < 0,5 |
| G. (g/L) | 6,37 \pm 0,52 | 6,40 \pm 0,27 | 6,39 \pm 0,31 | 6,36 \pm 0,10 | 6,48 \pm 0,23 | 6,42 \pm 0,15 | 6,31 \pm 0,22 | 6,31 \pm 0,10 | 6,31 \pm 0,27 | 6,31 \pm 0,30 | 6,34 \pm 0,27 | 6,33 \pm 0,14 |
| AT (g/LTH ₂) | 5,49 \pm 0,70 | 4,79 \pm 0,83 | 5,60 \pm 0,42 | 5,35 \pm 0,52 | 4,94 \pm 0,37 | 5,45 \pm 0,12 | 5,79 \pm 0,81 | 5,30 \pm 0,63 | 6,13 \pm 0,21 | 5,64 \pm 0,48 | 4,97 \pm 0,74 | 5,97 \pm 0,36 |
| AV (g/L AcH) | 0,330 \pm 0,065 | 0,310 \pm 0,078 | 0,324 \pm 0,042 | 0,350 \pm 0,110 | 0,307 \pm 0,098 | 0,312 \pm 0,127 | 0,157 \pm 0,015 | 0,147 \pm 0,080 | 0,136 \pm 0,056 | 0,251 \pm 0,030 | 0,218 \pm 0,077 | 0,226 \pm 0,081 |
| pH | 3,54 \pm 0,01 | 3,47 \pm 0,03 | 3,63 \pm 0,02 | 3,55 \pm 0,02 | 3,44 \pm 0,05 | 3,62 \pm 0,03 | 3,50 \pm 0,01 | 3,39 \pm 0,07 | 3,55 \pm 0,05 | 3,54 \pm 0,02 | 3,44 \pm 0,03 | 3,63 \pm 0,05 |
| Na (mg/L) | 67,8 \pm 0,8 | 67,5 \pm 0,5 | 69,1 \pm 0,7 | 62,0 \pm 0,3 | 61,0 \pm 0,5 | 62,0 \pm 0,5 | 64,0 \pm 0,4 | 63,7 \pm 0,5 | 65,1 \pm 0,2 | 63,7 \pm 0,4 | 64,0 \pm 0,3 | 66,1 \pm 0,4 |
| K (mg/L) | 516 \pm 1 | 526 \pm 3 | 512 \pm 2 | 508 \pm 1 | 572 \pm 3 | 571 \pm 10 | 566 \pm 2 | 554 \pm 5 | 531 \pm 3 | 545 \pm 2 | 596 \pm 7 | 591 \pm 5 |
| Fe (mg/L) | 2,03 \pm 0,80 | 1,96 \pm 0,50 | 1,65 \pm 0,30 | 1,90 \pm 0,50 | 2,03 \pm 0,30 | 1,33 \pm 0,5 | 2,81 \pm 0,75 | 3,37 \pm 0,64 | 2,28 \pm 0,84 | 2,03 \pm 0,60 | 2,34 \pm 0,42 | 1,75 \pm 0,32 |
| Mg (mg/L) | 61,6 \pm 1,5 | 61,0 \pm 1,3 | 63,4 \pm 2,1 | 61,3 \pm 1,3 | 62,3 \pm 1,8 | 63,2 \pm 0,9 | 61,0 \pm 0,8 | 61,0 \pm 0,5 | 63,3 \pm 0,2 | 63,6 \pm 1,7 | 64,6 \pm 0,5 | 67,0 \pm 1,3 |
| Ca (mg/L) | 89,3 \pm 1,5 | 85,1 \pm 1,0 | 85,4 \pm 0,9 | 87,0 \pm 1,9 | 75,0 \pm 3,5 | 80,5 \pm 1,2 | 91,1 \pm 1,9 | 83,5 \pm 2,1 | 76,7 \pm 1,3 | 89,1 \pm 2,7 | 87,0 \pm 2,4 | 86,0 \pm 1,9 |
| Cu (mg/L) | 3,50 \pm 0,13 | 4,56 \pm 1,31 | 3,93 \pm 0,54 | 0,79 \pm 0,05 | 0,58 \pm 0,12 | 1,26 \pm 0,08 | 2,83 \pm 0,16 | 1,23 \pm 0,57 | 2,52 \pm 0,25 | 1,60 \pm 0,10 | 1,06 \pm 0,27 | 1,57 \pm 0,09 |
| Zn (mg/L) | 1,40 \pm 0,30 | 2,37 \pm 1,10 | 1,55 \pm 0,60 | 0,65 \pm 0,15 | 0,72 \pm 0,09 | 0,64 \pm 0,05 | 1,67 \pm 0,35 | 1,97 \pm 0,27 | 1,97 \pm 0,42 | 0,83 \pm 0,29 | 1,08 \pm 0,13 | 1,09 \pm 0,20 |

A.R.: azúcares residuales, G: glicerina; AT: acidez total; AV: acidez volátil

Tabla 47. Análisis general de los vinos de *Moscatel de Alejandría* antes y después del tratamiento con enzimas (Media \pm DS)

| <i>Moscatel de Alejandría</i> | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | PC | PC 12G | PC AR | F | F 12G | F AR | CK | CK 12G | CK AR | ENSIS | ENSIS 12G | ENSIS AR |
| % v/v | 12,4 | 12,2 | 12,4 | 13,0 | 12,6 | 12,5 | 12,7 | 12,3 | 12,5 | 12,6 | 12,4 | 12,4 |
| | $\pm 0,4$ | $\pm 0,2$ | $\pm 0,2$ | $\pm 0,1$ | $\pm 0,2$ | $\pm 0,4$ | $\pm 0,6$ | $\pm 0,5$ | $\pm 0,3$ | $\pm 0,4$ | $\pm 0,2$ | $\pm 0,4$ |
| A. R. | 1,9 | < 0,6 | < 0,6 | 1,2 | 0,9 | < 0,6 | < 0,6 | < 0,6 | < 0,6 | 1,5 | 1,4 | < 0,6 |
| (g/L) | $\pm 0,6$ | | | $\pm 0,2$ | $\pm 0,5$ | | | | | $\pm 0,3$ | $\pm 0,3$ | |
| G. (g/L) | 6,35 | 6,44 | 6,53 | 6,25 | 6,36 | 6,53 | 6,28 | 6,37 | 6,51 | 6,29 | 6,34 | 6,50 |
| | $\pm 0,01$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,08$ | $\pm 0,07$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,09$ | $\pm 0,18$ | $\pm 0,12$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,07$ |
| AT | 5,09 | 4,90 | 4,86 | 5,42 | 5,12 | 5,43 | 5,49 | 5,32 | 5,41 | 5,49 | 4,97 | 5,00 |
| (g/LTH ₂) | $\pm 0,77$ | $\pm 0,81$ | $\pm 0,36$ | $\pm 0,79$ | $\pm 0,35$ | $\pm 0,63$ | $\pm 0,62$ | $\pm 0,54$ | $\pm 0,32$ | $\pm 0,45$ | $\pm 0,71$ | $\pm 0,39$ |
| AV | 0,321 | 0,315 | 0,307 | 0,344 | 0,327 | 0,311 | 0,212 | 0,241 | 0,231 | 0,325 | 0,385 | 0,332 |
| (g/L AcH) | $\pm 0,110$ | $\pm 0,123$ | $\pm 0,107$ | $\pm 0,140$ | $\pm 0,112$ | $\pm 0,132$ | $\pm 0,130$ | $\pm 0,114$ | $\pm 0,100$ | $\pm 0,160$ | $\pm 0,117$ | $\pm 0,171$ |
| pH | 3,40 | 3,51 | 3,60 | 3,55 | 3,56 | 3,48 | 3,54 | 3,52 | 3,43 | 3,54 | 3,49 | 3,57 |
| | $\pm 0,03$ | $\pm 0,09$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,07$ | $\pm 0,02$ |
| Na | 55,0 | 57,0 | 60,1 | 55,2 | 56,0 | 59,2 | 61,2 | 64,3 | 71,7 | 55,0 | 54,1 | 59,8 |
| (mg/L) | $\pm 2,0$ | $\pm 5,0$ | $\pm 3,0$ | $\pm 1,8$ | $\pm 2,0$ | $\pm 4,2$ | $\pm 2,3$ | $\pm 1,6$ | $\pm 3,1$ | $\pm 2,0$ | $\pm 5,3$ | $\pm 2,2$ |
| K | 1135 | 1130 | 955 | 1093 | 1137 | 956 | 1162 | 1145 | 1008 | 1150 | 1175 | 984 |
| (mg/L) | ± 128 | ± 114 | ± 210 | ± 97 | ± 101 | ± 154 | ± 109 | ± 126 | ± 87 | ± 117 | ± 99 | ± 136 |
| Fe | 3,24 | 4,00 | 3,12 | 4,50 | 4,60 | 4,25 | 3,40 | 3,96 | 3,53 | 3,55 | 3,41 | 3,20 |
| (mg/L) | $\pm 0,74$ | $\pm 0,58$ | $\pm 0,63$ | $\pm 1,19$ | $\pm 0,94$ | $\pm 0,34$ | $\pm 0,82$ | $\pm 0,28$ | $\pm 0,73$ | $\pm 0,80$ | $\pm 0,33$ | $\pm 0,65$ |
| Mg | 85,6 | 87,4 | 81,7 | 87,0 | 86,7 | 86,0 | 86,3 | 84,0 | 86,2 | 84,5 | 85,0 | 89,6 |
| (mg/L) | $\pm 1,8$ | $\pm 2,1$ | $\pm 3,8$ | $\pm 2,3$ | $\pm 1,2$ | $\pm 1,1$ | $\pm 1,4$ | $\pm 1,9$ | $\pm 0,78$ | $\pm 1,2$ | $\pm 1,1$ | $\pm 2,4$ |
| Ca | 64,0 | 100 | 30,7 | 113,0 | 107 | 33,2 | 68,0 | 76,1 | 33,0 | 61,1 | 76,0 | 33,2 |
| (mg/L) | $\pm 1,3$ | $\pm 10,1$ | $\pm 2,7$ | $\pm 0,5$ | $\pm 3,3$ | $\pm 1,2$ | $\pm 2,1$ | $\pm 1,9$ | $\pm 4,3$ | $\pm 1,3$ | $\pm 2,2$ | $\pm 2,0$ |
| Cu | 1,30 | 2,20 | 2,00 | 0,15 | 0,37 | 0,44 | 1,62 | 0,85 | 0,63 | 0,41 | 0,45 | 0,49 |
| (mg/L) | $\pm 0,68$ | $\pm 0,54$ | $\pm 0,32$ | $\pm 0,07$ | $\pm 0,11$ | $\pm 0,21$ | $\pm 0,60$ | $\pm 0,43$ | $\pm 0,12$ | $\pm 0,17$ | $\pm 0,08$ | $\pm 0,12$ |
| Zn | 0,71 | 1,93 | 1,18 | 0,40 | 0,81 | 0,40 | 0,64 | 1,23 | 0,63 | 0,47 | 0,87 | 0,49 |
| (mg/L) | $\pm 0,27$ | $\pm 0,51$ | $\pm 0,17$ | $\pm 0,05$ | $\pm 0,14$ | $\pm 0,09$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,18$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,21$ | $\pm 0,07$ |

A.R.: azúcares residuales, G: glicerina; AT: acidez total; AV: acidez volátil

V.4.2. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DEL VINO

Atendiendo a los vinos de *Palomino fino*, en las Fig. 60a y b se puede observar que el extracto enzimático Novoferm 12G influye notablemente tanto en el plano de color a^*b^* como en la luminosidad y cromaticidad de la muestra. Así, dichos vinos presentaron una coloración más amarilla ($b^*>0$), con menor luminosidad y mayor saturación frente a los vinos testigo y tratados con AR-2000. Estos vinos se caracterizaron, por tanto, por su mayor intensidad y pureza de color.

En los vinos de *Moscatel de Alejandría* (Fig. 61a y b), los vinos tratados con el extracto AR-2000 presentaron valores más altos del parámetro a^* que los vinos testigos y tratados con Novoferm 12G (-0,600 frente a 0,000 aproximadamente), lo que indica un aumento del color rojo. Visualmente, en estos vinos se observó una coloración rosada que fue más atribuida al del fenómeno oxidativo denominado “pinking” que al propio tratamiento enzimático. De hecho, la luminosidad y cromaticidad no se vieron afectadas por ninguno de los extractos enzimáticos utilizados, a excepción de la muestra ENSIS-AR que mostró mayor intensidad de color respecto incluso a las de su mismo grupo, lo que indica más claramente que los extractos enzimáticos no afectaron notablemente al color de estos vinos.

Nuestros resultados confirman los obtenidos por otros autores, los preparados enzimáticos pueden influir sobre el color de los vinos blancos ya que la actividad glucosidasa libera también polifenoles enlazados a moléculas de azúcares. Sin embargo, puede ocurrir que los extractos enzimáticos no afecten directamente al contenido en polifenoles (ABS 280) pero sí sobre los parámetros CIELAB, dependiendo lógicamente de la variedad y el extracto empleado (Sánchez-Palomo y col., 2005).

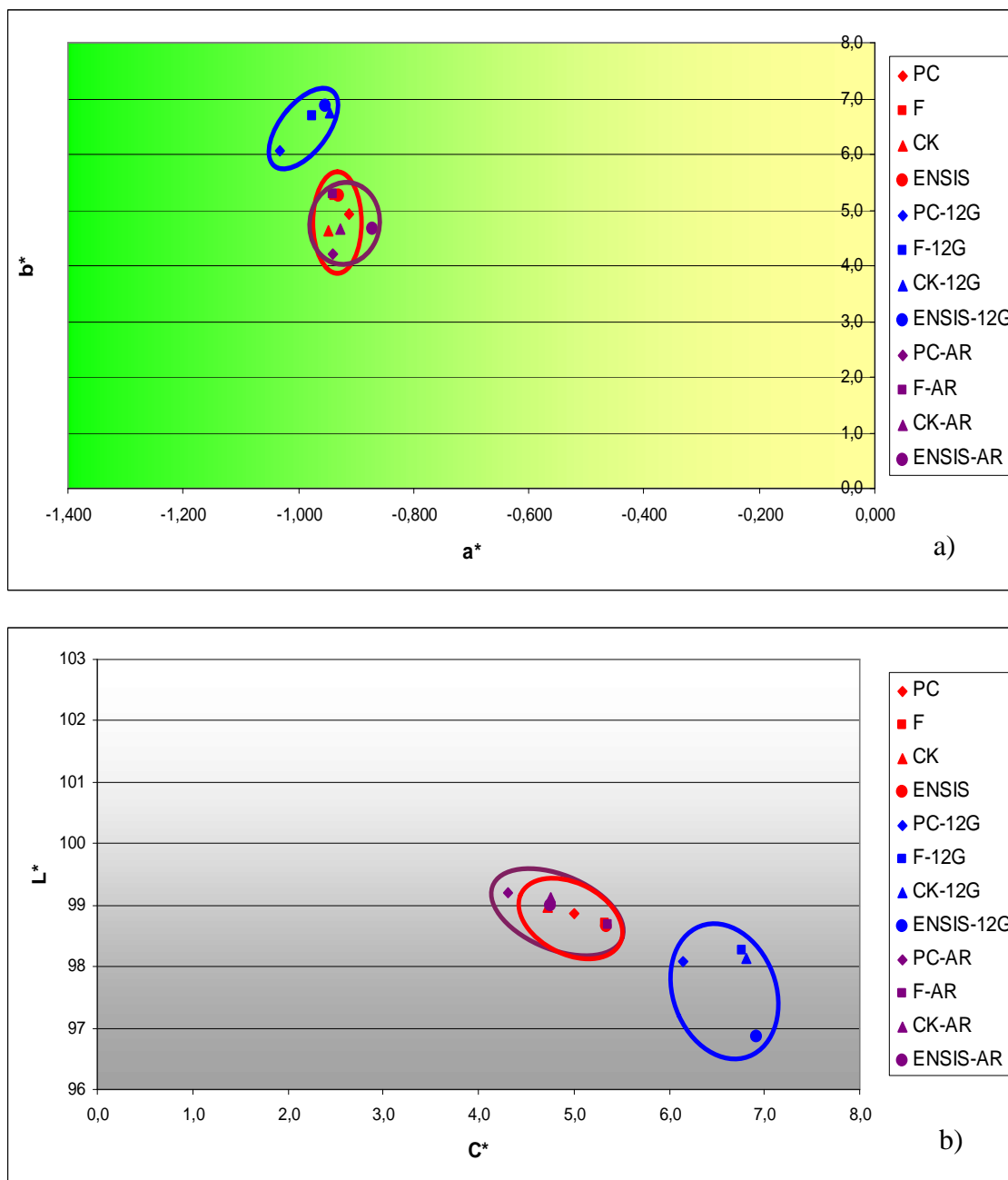


Fig. 60. Localización de los vinos *Palomino fino* en el plano de color a^*b^* (a) y L^*C^* (b) del espacio CIELAB

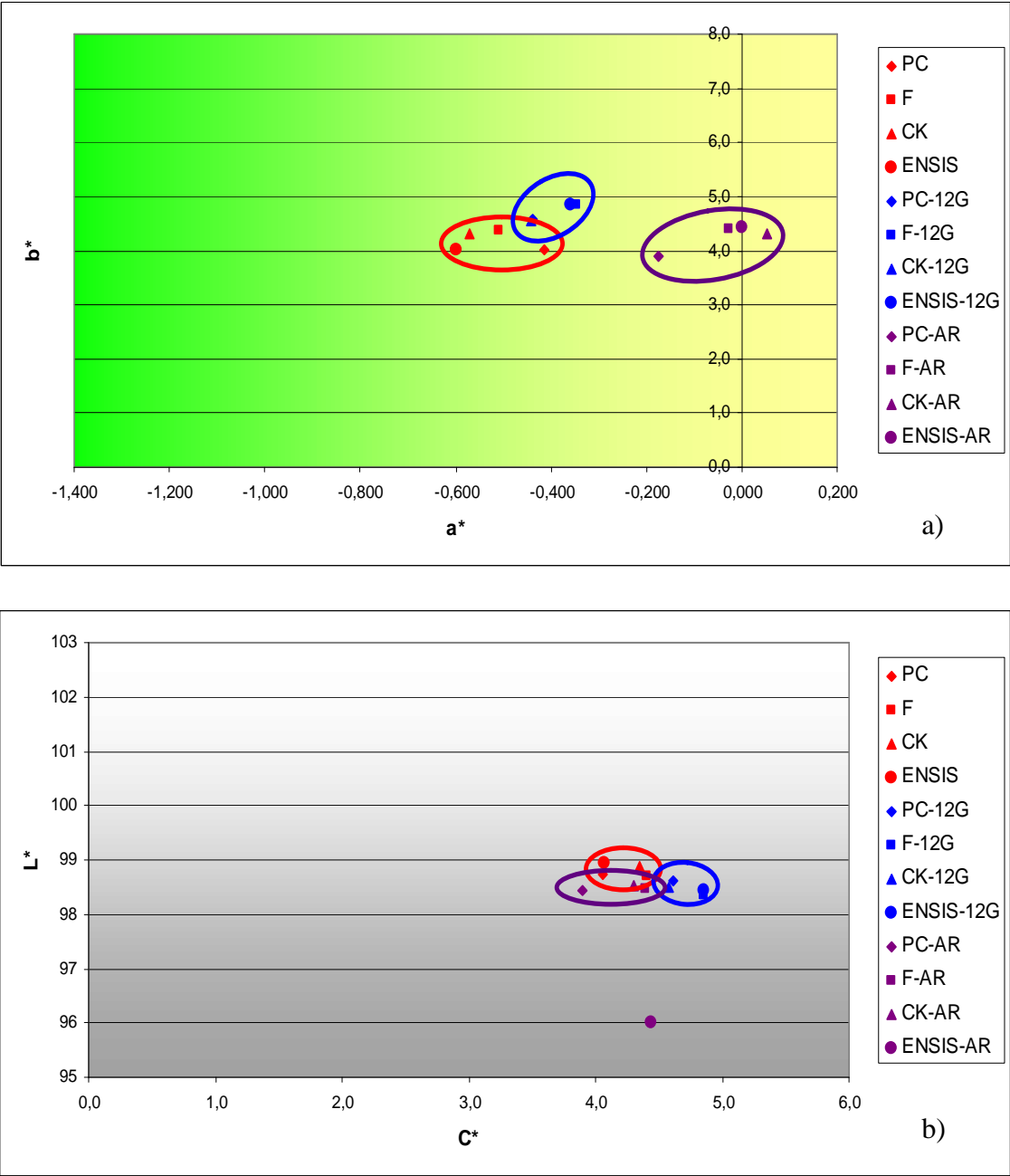


Fig. 61. Localización de los vinos *Moscatel de Alejandría* en el plano de color a^*b^* (a) y L^*C^* (b) del espacio CIELAB.

V.4.3. INFLUENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO

4.3.1. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles mayoritarios

En las Figuras 62 y 63 se recogen los niveles de metanol y alcoholes superiores para los vinos de *Palomino fino* y de *Moscatel de Alejandría* respectivamente. En dichas figuras se comparan los vinos testigos elaborados con las distintas cepas de levadura con los tratados con los diferentes preparados enzimáticos comerciales (Novoferm 12G y AR 2000).

Como se puede observar, los extractos enzimáticos empleados en estos ensayos parecen ejercer una influencia sobre el metanol y los alcoholes superiores, más clara en los vinos de *Moscatel*, en los cuales se produce siempre una disminución de alcoholes con ambos extractos, sobre todo en el AR 2000. Sólo cuando la cepa de vinificación es la PC, parece que la disminución de alcoholes superiores es más importante tras el empleo de dichos enzimas.

Hasta la fecha no se han encontrado referencias bibliográficas sobre el efecto de los extractos enzimáticos sobre alcoholes superiores. Tampoco hay indicios de que los extractos enzimáticos posean actividad alguna que produzca dicho fenómeno, puesto que sus principales actividades son pectinasa y β -glucosidasa, además de otras actividades residuales como β -D-adiposidasa, arabinosidasa, etc. en el caso de la AR2000. Sin embargo, se observa de manera generalizada, sobre todo con AR 2000, una disminución de los alcoholes isoamílicos, concretamente del 3-metil-1-butanol. Esta disminución es mucho más importante en el caso de los vinos de *Moscatel*.

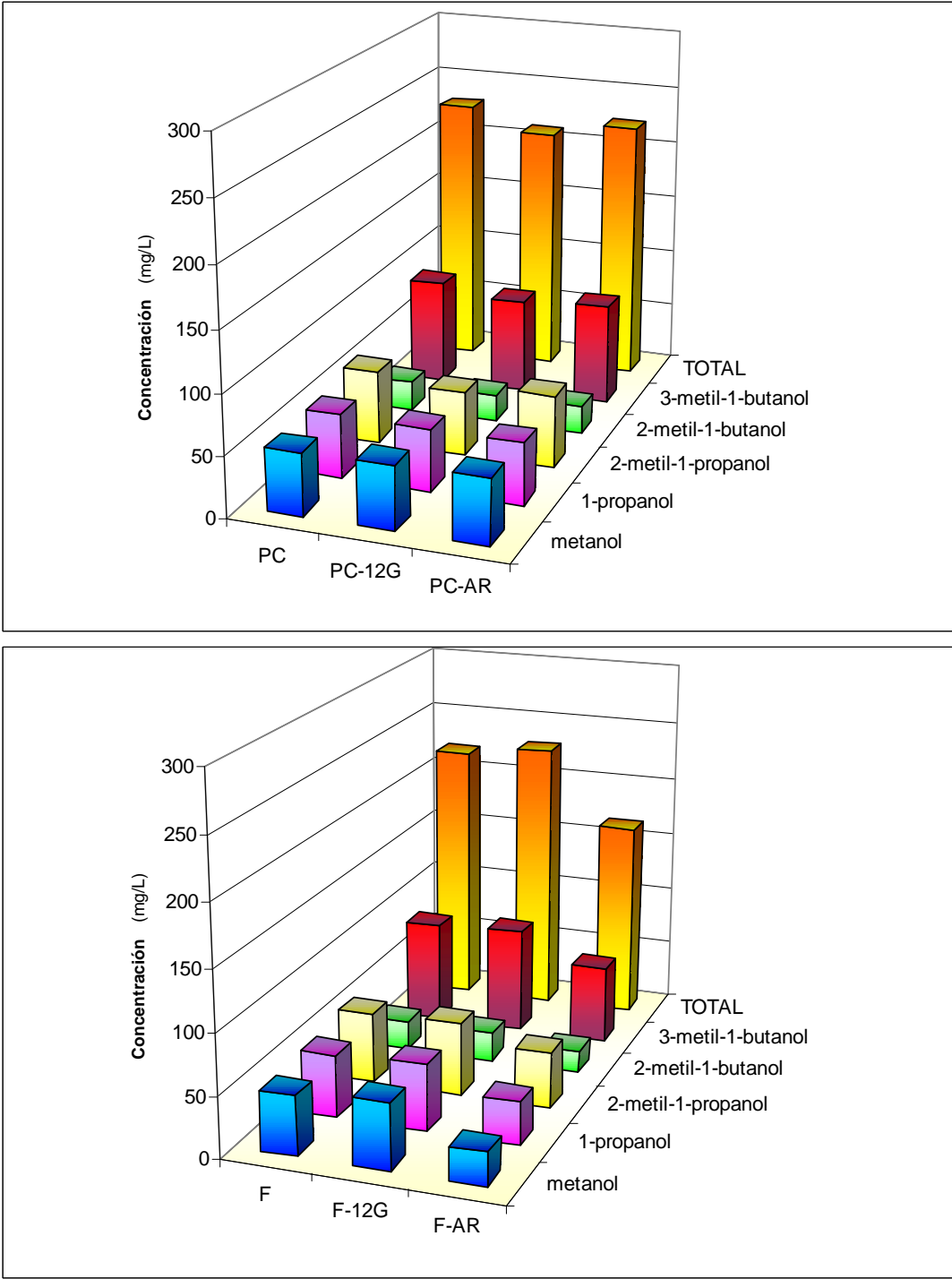


Fig. 62. Influencia del preparado enzimático sobre la concentración de alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Palomino fino* elaborados con distintas cepas de levadura

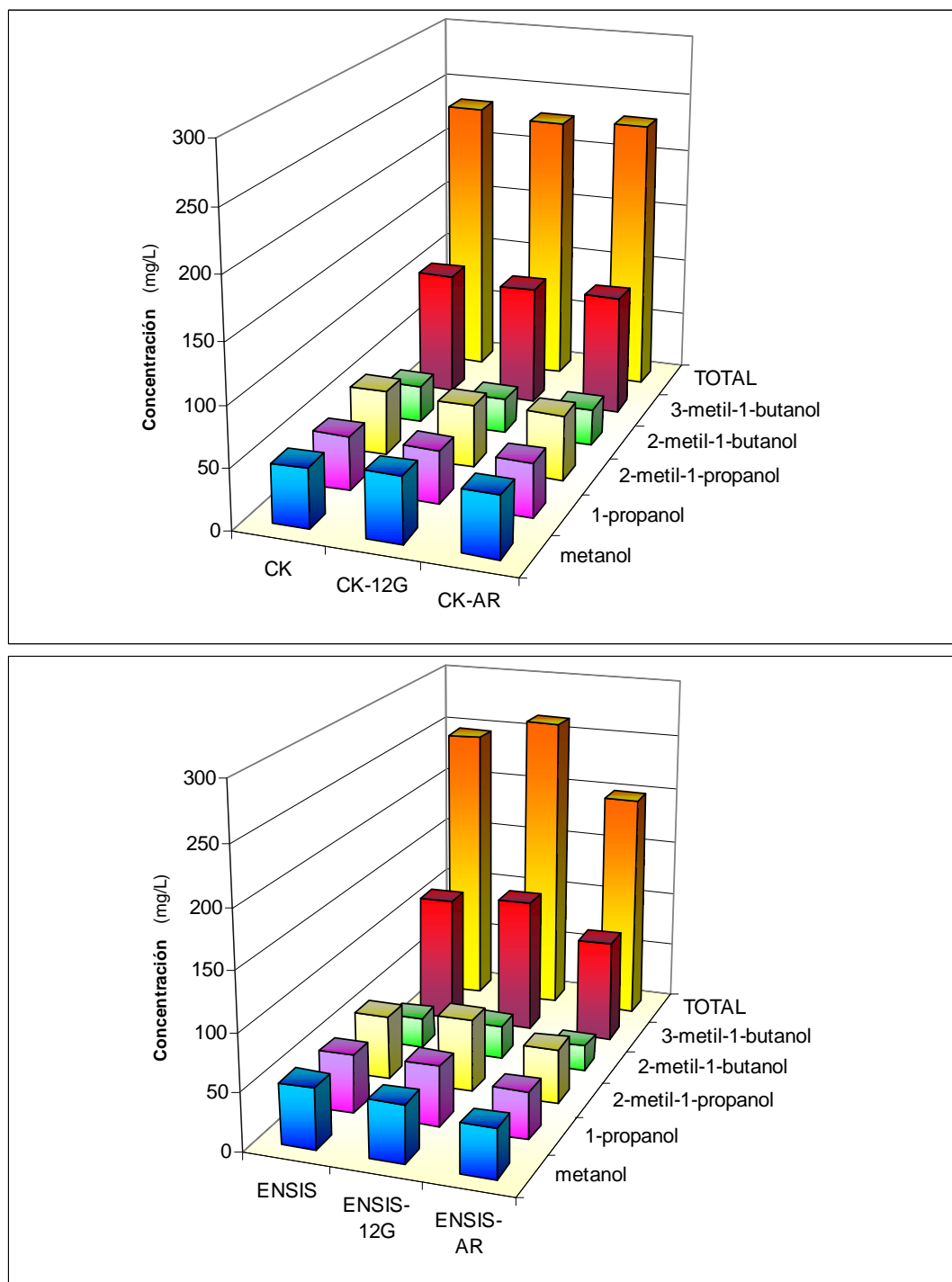


Fig. 62 (continuación). Influencia del preparado enzimático sobre la concentración de alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Palomino fino* elaborados con distintas cepas de levadura

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

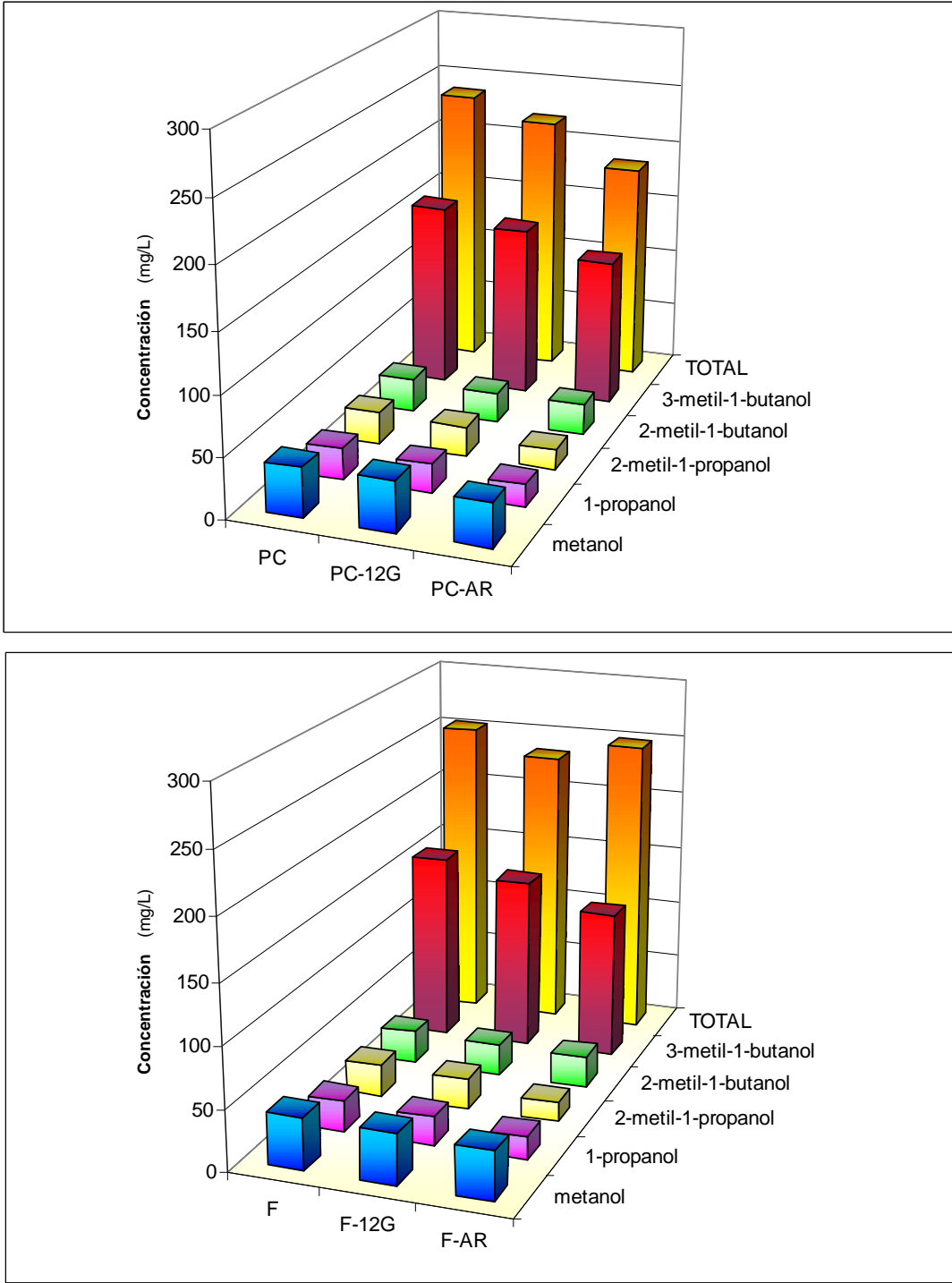


Fig. 63. Influencia del preparado enzimático sobre la concentración de alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Moscatel de Alejandria* elaborados con distintas cepas de levadura

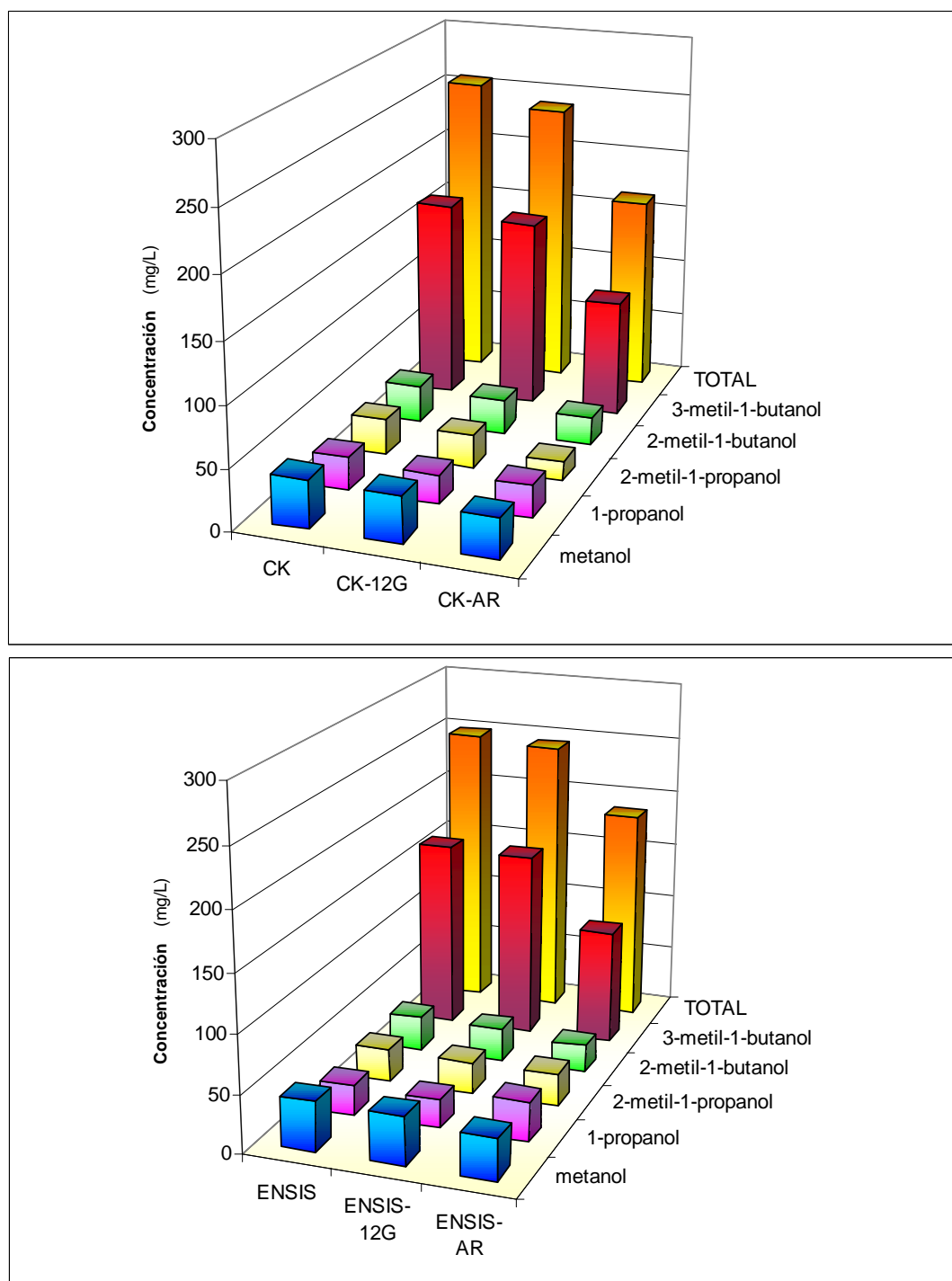


Fig. 63 (continuación). Influencia del preparado enzimático sobre la concentración de alcoholes superiores (mg/L) en los vinos de *Moscatel de Alejandria* elaborados con distintas cepas de levadura

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 48. Concentración de compuestos carbonilo (mg/L) en los vinos *Palomino fino* antes y después del tratamiento con enzimas

| COMPUESTOS CARBONILO (mg/L) | PC | PC 12G | PC AR | F | F 12G | F AR | CK | CK 12G | CK AR | ENSIS | ENSIS 12G | ENSIS AR |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Acetaldehído | 150,00 ± 1,10 | 168,00 ± 1,03 | 204,76 ± 0,89 | 80,00 ± 0,92 | 98,00 ± 1,08 | 116,67 ± 0,51 | 30,00 ± 0,53 | 34,00 ± 1,66 | 35,81 ± 0,72 | 34,00 ± 1,52 | 45,00 ± 0,64 | 42,04 ± 0,43 |
| Acetato etilo | 63,00 ± 1,50 | 53,00 ± 0,70 | 55,73 ± 1,13 | 50,00 ± 1,34 | 48,00 ± 0,72 | 47,14 ± 0,85 | 40,00 ± 1,71 | 37,00 ± 0,97 | 33,78 ± 1,03 | 26,00 ± 0,86 | 28,20 ± 1,12 | 27,60 ± 1,12 |
| Total compuestos carbonilo | 213,00 ± 1,50 | 221,00 ± 1,03 | 260,50 ± 1,13 | 130,00 ± 1,34 | 146,00 ± 1,08 | 163,80 ± 0,85 | 73,00 ± 1,71 | 71,00 ± 1,66 | 69,59 ± 1,63 | 60,00 ± 1,52 | 73,20 ± 1,12 | 69,60 ± 1,12 |

Tabla 49. Concentración de compuestos carbonilo (mg/L) en los vinos *Moscatel de Alejandría* antes y después del tratamiento con enzimas

| COMPUESTOS CARBONILO (mg/L) | PC | PC 12G | PC AR | F | F 12G | F AR | CK | CK 12G | CK AR | ENSIS | ENSIS 12G | ENSIS AR |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Acetaldehído | 81,00 ± 3,61 | 119,00 ± 1,72 | 147,09 ± 0,87 | 46,00 ± 1,56 | 41,00 ± 0,47 | 81,58 ± 0,93 | 23,00 ± 0,21 | 32,00 ± 1,15 | 44,50 ± 2,10 | 53,00 ± 2,26 | 81,00 ± 1,96 | 80,12 ± 0,71 |
| Acetato etilo | 19,00 ± 0,64 | 60,00 ± 1,54 | 34,87 ± 1,01 | 37,00 ± 1,20 | 48,00 ± 2,10 | 6,73 ± 0,77 | 17,00 ± 0,35 | 14,00 ± 0,89 | ns | 25,00 ± 0,85 | 26,00 ± 1,47 | 25,00 ± 0,91 |
| Total compuestos carbonilo | 100,00 ± 3,61 | 179,00 ± 1,72 | 181,96 ± 1,01 | 83,00 ± 1,56 | 89,00 ± 2,10 | 88,31 ± 0,93 | 40,00 ± 0,35 | 46,00 ± 1,15 | 44,50 ± 2,10 | 78,00 ± 2,26 | 107,00 ± 1,96 | 105,12 ± 0,91 |

En cuanto a los compuestos carbonilo, en las Tablas 48 y 49 se recogen los resultados obtenidos para los vinos de las distintas variedades (*Palomino* y *Moscatel* respectivamente). Como se puede observar, no existen diferencias significativas en el contenido total de dichos compuestos con el uso de los diferentes extractos, pero sí se observa un ligero aumento de dichos compuestos en los vinos tratados con respecto a sus correspondientes testigos, sobre todo para las cepas PC y F. Dicho incremento podría deberse a que tras el deslío, quedan levaduras en el medio que podrían seguir produciendo pequeñas cantidades de compuestos carbonilo, sobre todo acetaldehído. Es el caso de los vinos elaborados con PC, que como decíamos anteriormente es una cepa autóctona de la zona de Jerez con capacidad de transcribir su metabolismo aerobio y con potencial para seguir formando acetaldehído durante las dos semanas de tratamiento enzimático.

4.3.2. Influencia sobre el contenido en compuestos volátiles minoritarios

Dada la gran cantidad de aromas y de muestras a comparar en este apartado y la complejidad de los mismos, en vez de representar gráficamente o en tablas los resultados obtenidos para los distintos aromas y en los distintos vinos tratados y sin tratar con cada uno de los preparados enzimáticos, finalmente se decidió reducir dicha información a las variaciones que los distintos tratamientos producen en el contenido de aromas (expresados en %) con respecto al vino testigo (no tratado con enzimas). Dichos resultados se recogen en las tablas 50 y 51 para las variedades *Palomino* y *Moscatel* respectivamente.

Uno de los aspectos más importantes a destacar de dichas tablas es que el tratamiento enzimático afecta considerablemente al contenido en aromas de los vinos tratados. De forma general, se observa en muchos casos una disminución del contenido en aromas. Este efecto se debe principalmente a una disminución acusada de ésteres, que afecta principalmente al acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Esta disminución, es mucho más acentuada con la variedad *Moscatel* y el preparado enzimático AR 2000, donde la pérdida de la mayoría de estos compuestos es total. Con la Novoferm 12G la disminución también es importante aunque no llega a la eliminación total. Este hecho pone de manifiesto que ambos preparados poseen algún tipo de actividad secundaria de carácter hidrolítico que afecta principalmente a dichos ésteres. Tamborra y col. (2004), ya pusieron de manifiesto la presencia de dicha actividad al observar una disminución considerable de los acetatos de isoamilo y feniletilo en vinos tratados con el preparado AR 2000. Asimismo, dichos autores afirmaban que dicho extracto poseía también actividad esterasa dada la importante formación de succinato de dietilo. En nuestros resultados también observamos un incremento del contenido en succinato de dietilo superando el 60% en la mayoría de los vinos de *Palomino* y el 70% en los vinos de *Moscatel*. Estos fenómenos van a afectar negativamente al perfil sensorial de estos vinos y también podrían deberse a fenómenos parciales de oxidación producidos en la etapa de almacenamiento de los vinos durante el tratamiento enzimático.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 50. Variación de los compuestos aromáticos minoritarios (%) en los vinos *Palomino fino* tras el tratamiento enzimático

| | PC | | F | | CK | | ENSIS | |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 12G | AR | 12G | AR | 12G | AR | 12G | AR |
| ACIDOS | | | | | | | | |
| Hexanoico | 40,2 | -7,8 | 7,9 | -10,3 | -9,2 | -19,3 | -6,5 | 10,1 |
| Octanoico | 23,0 | -20,8 | 12,9 | -26,5 | -12,9 | -48,4 | -14,2 | -11,8 |
| Total ácidos | 26,3 | -18,3 | 11,9 | -23,1 | -12,1 | -42,3 | -12,5 | -7,0 |
| TERPENOS | | | | | | | | |
| Citronelol | -8,1 | -40,0 | -24,3 | 23,0 | -37,0 | 41,9 | -37,4 | 67,9 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | -7,5 | -3,1 | -11,7 | -12,4 | -2,6 | -27,4 | 69,3 | 21,4 |
| Total terpenos | -7,8 | -18,6 | -17,8 | 4,9 | -21,8 | 11,2 | 11,5 | 46,6 |
| ALCOHOLES | | | | | | | | |
| Isobutanol | -45,3 | 47,6 | -61,6 | 6,0 | -49,1 | -45,8 | -34,9 | 23,3 |
| 2-butil-1-octanol | 25,4 | 100,0 | -51,2 | 100,0 | -43,4 | 100,0 | -34,5 | -100,0 |
| 1-hexanol | -16,1 | 8,2 | -29,0 | -5,1 | -27,3 | 0,2 | -24,5 | 1,0 |
| trans-3-hexen-1-ol | 237,3 | 15,9 | -10,9 | 5,5 | -13,6 | 25,4 | -1,2 | 9,6 |
| 3-etoxi-1-propanol | 42,2 | 6,9 | -3,1 | -100,0 | -12,6 | 13,6 | -18,2 | 8,0 |
| cis-3-hexen-1-ol | 33,2 | 15,5 | -15,5 | 5,4 | -12,8 | 2,4 | 0,1 | 11,6 |
| Alcohol bencílico | 6,1 | -100,0 | -50,5 | -100,0 | -13,4 | -100,0 | 10,1 | -100,0 |
| Alcohol feniletilo | 17,0 | 4,0 | 44,4 | 54,0 | -8,0 | -13,8 | 1,0 | 18,0 |
| Total alcoholes | 12,4 | 4,7 | 32,2 | 44,4 | -10,3 | -13,1 | -1,5 | 15,4 |
| FENOLES VOLÁTILES | | | | | | | | |
| 2,6-diterbutil-4-etilfenol | 71,3 | -3,9 | -10,8 | 11,6 | -42,7 | -29,1 | 21,1 | 20,0 |
| Total fenoles | 71,3 | -3,9 | -10,8 | 11,6 | -42,7 | -29,1 | 21,1 | 20,0 |
| ÉSTERES | | | | | | | | |
| Acetato de isoamilo | -90,9 | -73,3 | -95,5 | -265,0 | -94,8 | -100,0 | -95,6 | -100,0 |
| Hexanoato de etilo | -100,0 | -19,6 | -100,0 | -41,7 | 35,2 | -75,9 | -90,1 | -88,2 |
| Octanoato de etilo | -35,1 | -22,2 | -69,6 | -15,4 | -71,9 | 11,1 | -73,2 | -8,7 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 72,6 | -38,1 | 92,6 | 21,5 | -23,5 | 78,6 | -100,0 | -32,9 |
| Decanoato de etilo | -41,3 | -100,0 | -60,7 | -86,3 | -58,0 | -62,5 | -70,2 | -71,3 |
| Succinato de dietilo | 167,9 | 64,9 | 99,0 | 63,3 | 63,5 | 69,4 | 25,2 | 65,0 |
| 9-Decenoato de etilo | -3,9 | -38,6 | -33,3 | -31,3 | -58,9 | -29,0 | -62,9 | -31,9 |
| Pentanoato de etilo | 124,3 | -10,5 | -30,4 | -13,5 | -22,4 | -16,2 | -10,4 | 10,8 |
| Acetato de feniletilo | -1,4 | -14,9 | 25,9 | -4,9 | -18,3 | -22,8 | -48,1 | -6,3 |
| Total ésteres | 13,8 | -36,2 | -26,7 | -29,6 | -30,2 | -18,7 | -48,5 | -19,1 |
| TIOLES | | | | | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | 177,4 | -3,2 | 38,7 | 70,6 | -3,5 | 2,8 | -2,0 | 26,1 |
| Total tioles | 177,4 | -3,2 | 38,7 | 70,6 | -3,5 | 2,8 | -2,0 | 26,1 |
| TOTAL AROMAS | 16,2 | -3,2 | 17,9 | -0,4 | -13,6 | -0,2 | -11,4 | -0,3 |

Tabla 51. Variación de los compuestos aromáticos minoritarios (%) en los vinos *Moscatel de Alejandría* tras el tratamiento enzimático

| | PC | | F | | CK | | ENSIS | |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 12G | AR | 12G | AR | 12G | AR | 12G | AR |
| ACIDOS | | | | | | | | |
| Isovalérico | 46,0 | -0,9 | 23,8 | 4,6 | 34,1 | -7,0 | 23,2 | -22,5 |
| Hexanoico | 5,8 | 2,7 | -12,3 | -3,9 | -2,3 | -0,2 | -17,1 | -23,4 |
| Octanoico | 3,8 | -5,4 | -10,6 | -28,0 | 3,7 | -8,7 | -3,9 | -66,0 |
| Total ácidos | 4,5 | -3,4 | -10,7 | -2,6 | 2,5 | 29,9 | -6,7 | -41,0 |
| TERPENOS | | | | | | | | |
| Linalool | 25,6 | 13,4 | 30,6 | 14,7 | 21,1 | 8,2 | 23,2 | 9,1 |
| α -terpineol | 36,8 | 15,4 | 31,7 | 9,9 | 26,6 | 11,8 | 26,6 | -0,1 |
| Citronelol | 15,1 | 1,2 | 6,9 | 1,9 | 3,1 | -1,3 | 0,1 | -12,5 |
| Geraniol | 214,7 | -100,0 | 78,3 | 77,9 | 243,9 | -100,0 | 94,9 | -100,0 |
| Nerol | -81,9 | -100,0 | 55,1 | -100,0 | 74,7 | -100,0 | 72,9 | -100,0 |
| trans-óxido de linalol | 34,3 | 11,0 | 29,0 | 30,2 | 37,3 | 15,4 | 76,9 | 17,6 |
| cis-óxido de linalol | 2,7 | 20,9 | 38,1 | -24,0 | 15,1 | 18,0 | 33,1 | -12,2 |
| 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol | 12,9 | 4,4 | -2,9 | -4,1 | 1,0 | 2,8 | -19,2 | -26,3 |
| 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol | -8,2 | -5,2 | -6,1 | -23,4 | 14,2 | -41,5 | 0,2 | -114,7 |
| 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol | 68,8 | 35,6 | 63,0 | 47,4 | 25,7 | 42,7 | 174,5 | 34,3 |
| Total terpenos | 20,5 | 3,2 | 10,3 | 0,9 | 14,6 | -0,4 | 0,6 | -23,5 |
| ALCOHOLES | | | | | | | | |
| Isobutanol | -13,7 | -20,9 | -13,2 | -1,3 | -25,6 | -27,4 | -33,1 | 46,5 |
| Isohexanol | -17,1 | -15,9 | -17,5 | 6,0 | -31,0 | -12,4 | -20,2 | 22,4 |
| 3-metil-1-pentanol | -19,9 | -10,5 | -13,2 | -2,8 | -19,4 | -3,9 | -20,3 | 3,0 |
| 1-hexanol | -2,3 | -4,9 | -3,3 | 5,9 | -11,2 | -1,0 | -9,0 | 11,0 |
| trans-3-hexen-1-ol | 833,3 | -8,3 | -90,5 | 9,1 | -13,1 | -2,2 | -15,8 | 2,1 |
| 3-etoxi-1-propanol | -34,4 | 70,1 | -33,1 | -100,0 | -30,7 | -63,7 | -35,0 | -82,6 |
| cis-3-hexen-1-ol | -0,5 | -6,9 | -4,9 | 8,7 | -11,9 | -5,6 | -16,7 | -1,4 |
| Alcohol feniletilo | 10,0 | 5,6 | -4,2 | -7,6 | 6,5 | 2,6 | -13,4 | -50,0 |
| Total alcoholes | 9,5 | 5,2 | -4,4 | -7,3 | 5,8 | 2,3 | -13,4 | -48,3 |
| ÉSTERES | | | | | | | | |
| Butirato de etilo | -86,3 | -100,0 | -83,2 | -100,0 | -77,1 | -100,0 | -68,8 | -29,4 |
| Acetato de isoamilo | -89,2 | -100,0 | -88,4 | -100,0 | -87,0 | 25,7 | -75,7 | -100,0 |
| Hexanoato de etilo | -78,9 | -100,0 | -75,8 | -100,0 | -76,8 | -100,0 | -63,7 | -100,0 |
| Acetato de hexilo | -88,9 | -100,0 | -86,5 | -100,0 | -85,1 | -100,0 | -69,4 | -100,0 |
| Acetato de cis-hexenol | -54,6 | -100,0 | -57,6 | -100,0 | -53,2 | 74,6 | -31,8 | -73,4 |
| Octanoato de etilo | -50,5 | -76,4 | -51,9 | -50,1 | -48,2 | -75,3 | -49,5 | -76,3 |
| Decanoato de etilo | -31,5 | -100,0 | -37,2 | -100,0 | -31,2 | -100,0 | -36,7 | -100,0 |
| Succinato de dietilo | 45,4 | 74,4 | 39,3 | 70,3 | 22,4 | 77,4 | 23,1 | 75,9 |
| 9-Decenoato de etilo | -16,8 | -83,7 | -44,7 | -45,5 | -30,2 | -83,0 | -57,0 | -100,0 |
| Pentanoato de etilo | -0,9 | 0,0 | -6,0 | 0,0 | -4,9 | 0,0 | -21,8 | 0,0 |
| Acetato de feniletilo | 15,2 | -14,6 | -8,1 | -35,3 | 11,0 | -21,0 | -14,2 | -63,8 |
| Total ésteres | -13,3 | -40,4 | -24,4 | -37,6 | -13,6 | -31,9 | -28,7 | -58,3 |
| TIOLES | | | | | | | | |
| 3-metiltio-1-propanol | -7,7 | -17,3 | -0,1 | 0,1 | -0,1 | -0,1 | -0,2 | -0,2 |
| Total tioles | -7,7 | -17,3 | -0,1 | 0,1 | -0,1 | -0,1 | -0,2 | -0,2 |
| TOTAL AROMAS | 4,7 | -6,6 | -8,7 | -10,3 | 2,3 | 5,6 | -12,3 | -44,8 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto al efecto sobre los terpenos, en la Tabla 50 para los vinos de *Palomino* se observa que el tratamiento enzimático con AR2000 aumenta considerablemente el contenido en citronelol (a excepción del vino PC), probablemente debido a las demás actividades colaterales β -D-adiposidasa, α -L-arabinosidasa, y α -L-rhamnosidasa que presenta dicho extracto y que favorece la rotura de rutinósidos, arabinosilglucósidos y adiposilglucósidos para después permitir la actuación de las β -glucosidasas y liberar así el citronelol. Con el preparado Novoferm 12G, sin embargo, ocurre todo lo contrario, observándose una disminución del contenido en dicho compuesto. Estudios previos realizados por Valcárcel (2006) utilizando el extracto Novarom G, con mayor pureza en actividad β -glucosidasa, ponen de manifiesto que se puede aumentar ligeramente el contenido en terpenos en los vinos de la variedad *Palomino fino* (27%). En nuestro caso el aumento puede ser más importante dependiendo de la cepa de levadura empleada en la fermentación, que determina su contenido en precursores aromáticos.

Para los vinos de *Moscatel*, se produce un incremento de los compuestos terpénicos totales con ambos extractos, salvo los vinos CK y ENSIS tratados con AR2000, donde globalmente se produce una disminución debido a la pérdida total de nerol y geraniol muy característicos de la variedad *Moscatel*. Esto puede conducir a una pérdida de la tipicidad en el aroma. El aumento en terpenos totales se debe principalmente al incremento en linalol, α -terpineol, citronelol y hotrienol, obteniéndose los mejores resultados con el extracto Novoferm 12G que, además, aumenta considerablemente los niveles de geraniol.

En estos vinos, los mejores resultados en cuanto a liberación de terpenos se obtienen, como se dijo anteriormente, con el extracto Novoferm 12G, pero además cuando la cepa de levadura usada durante la vinificación da lugar a una baja proporción de aromas, como es el caso de la PC. En el caso de una variedad muy aromática, como la *Moscatel*, la cantidad de aromas libres y, sobre todo terpenos es muy importante, luego la liberación de estos compuestos que se produce con el uso de preparados enzimáticos no es muy significativa siempre y cuando la cepa de levadura usada durante la fermentación permita liberar estos

precursores aromáticos. Por ello, se obtienen siempre mejores resultados cuando se emplean los preparados enzimáticos en vinos en los que el contenido en terpenos se encuentra principalmente glucosilado.

En cuanto al resto de los compuestos aromáticos, los resultados son bastante variables destacando sólo que para los vinos de ambas variedades elaborados con la cepa PC se incrementa considerablemente el contenido en trans-3-hexen-1-ol.

En la Tabla 52 se resumen los efectos de los preparados comerciales sobre ésteres y terpenos. A la vista de los resultados, ningún preparado enzimático ha dado resultados totalmente favorables, destacando los efectos negativos producidos por el AR2000 sobre los vinos de *Moscatel*.

Tabla 52. Resumen de los efectos de los preparados enzimáticos Novoferm 12G y AR 2000 obtenidos en los vinos de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*.

| | <i>Palomino fino</i> | <i>Moscatel de Alejandría</i> |
|---------------------|--|---|
| Novoferm 12G | <p>Pérdida significativa de ésteres afrutados</p> <p>Aumento del succinato de dietilo</p> <p>Disminución de citrionelol</p> | <p>Ligera disminución de alcoholes isoamílicos (3-metil-1-butanol)</p> <p>Aumento en terpenos totales</p> <p>Significativa pérdida de ésteres</p> <p>Aumento del succinato de dietilo</p> <p>Aumento de acetaldehído con PC</p> |
| AR2000 | <p>Aumento significativo del acetaldehído (sobre todo en PC)</p> <p>Disminución de los alcoholes isoamílicos (3-metil-1-butanol)</p> <p>Incremento de citrionelol</p> <p>Pérdida significativa de ésteres aromáticos</p> <p>Aumento significativo del succinato de dietilo</p> | <p>Aumento significativo del acetaldehído (sobre todo en PC)</p> <p>Disminución de los alcoholes isoamílicos (3-metil-1-butanol)</p> <p>Pérdida total de geraniol y nerol</p> <p>Pérdida total de la mayoría de ésteres afrutados</p> <p>Aumento significativo del succinato de dietilo</p> |

4.3.3. Influencia sobre el valor de aroma

Dado que los preparados enzimáticos empleados en nuestros ensayos modifican principalmente los ésteres y los compuestos terpénicos y derivados, se decidió tener en cuenta sólo dichos compuestos para estudiar la influencia sobre el valor de aroma. Asimismo, sólo se tuvieron en cuenta aquellos compuestos que presentaron VAOs >1. Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 64-65 y 66-67 para los vinos de *Palomino* y *Moscatel* respectivamente.

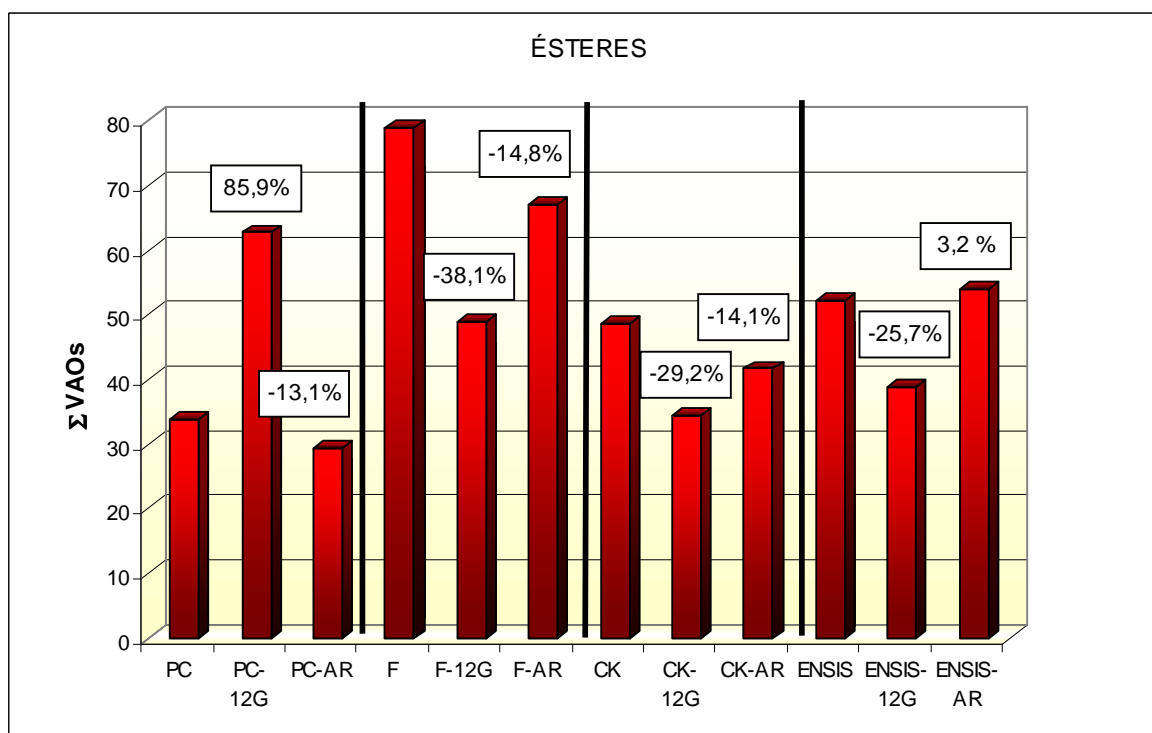


Fig.64. Influencia del preparado enzimático sobre el aroma afrutado (Σ VAOs ésteres) de los vinos de *Palomino fino* elaborados con distintas cepas de levadura

Como se puede observar en la Fig. 64, sólo en el caso de los vinos de *Palomino* elaborados con la cepa PC y tratados con el preparado Novoferm 12G se produce un incremento del carácter afrutado como consecuencia de un aumento de los VAOs de los ésteres hexanoato, octanoato y pentanoato de etilo, responsables de los aromas a manzana, pera y piña.

En el resto de los casos, excepto para ENSIS-AR, se produce una disminución de los VAOs debido a una disminución general del contenido en ésteres ya comentada en el apartado anterior.

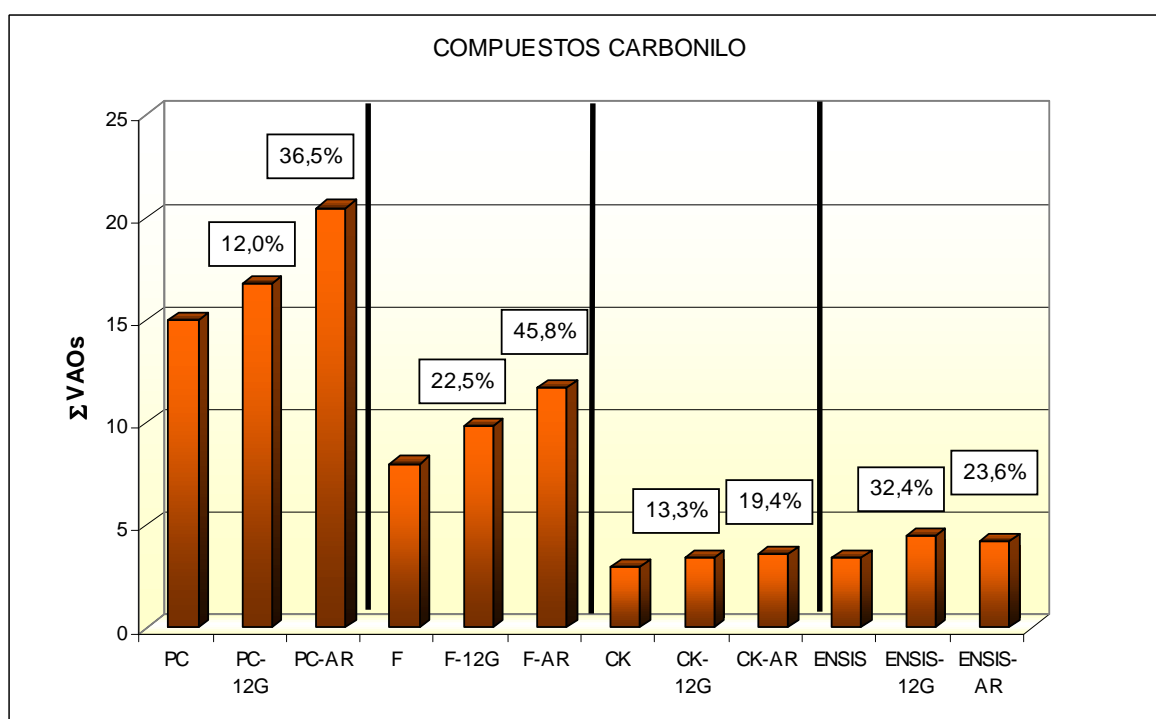


Fig.65. Influencia del preparado enzimático sobre los aromas “otros” (ΣVAOs compuestos carbonilo) de los vinos de *Palomino fino* elaborados con distintas cepas de levadura

Los compuestos carbonilo, y principalmente el acetaldehído (Fig. 65), aumentan en todos los casos tras la aplicación de los extractos enzimáticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

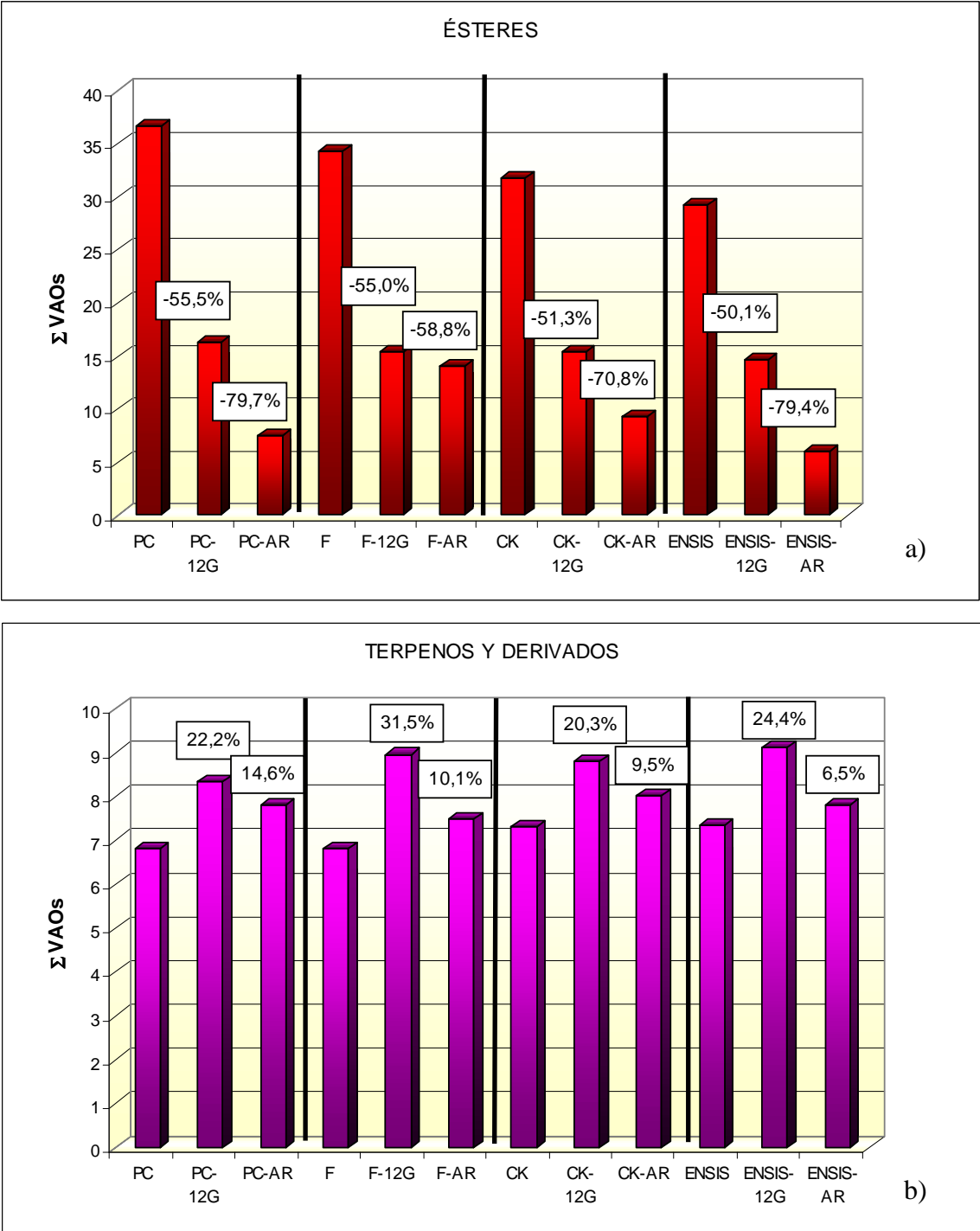


Fig.66. Influencia del preparado enzimático sobre los aromas afrutados (a) y florales (b) (ΣVAOs ésteres y terpenos y derivados respectivamente) de los vinos de *Moscatel de Alejandria* elaborados con distintas cepas de levadura

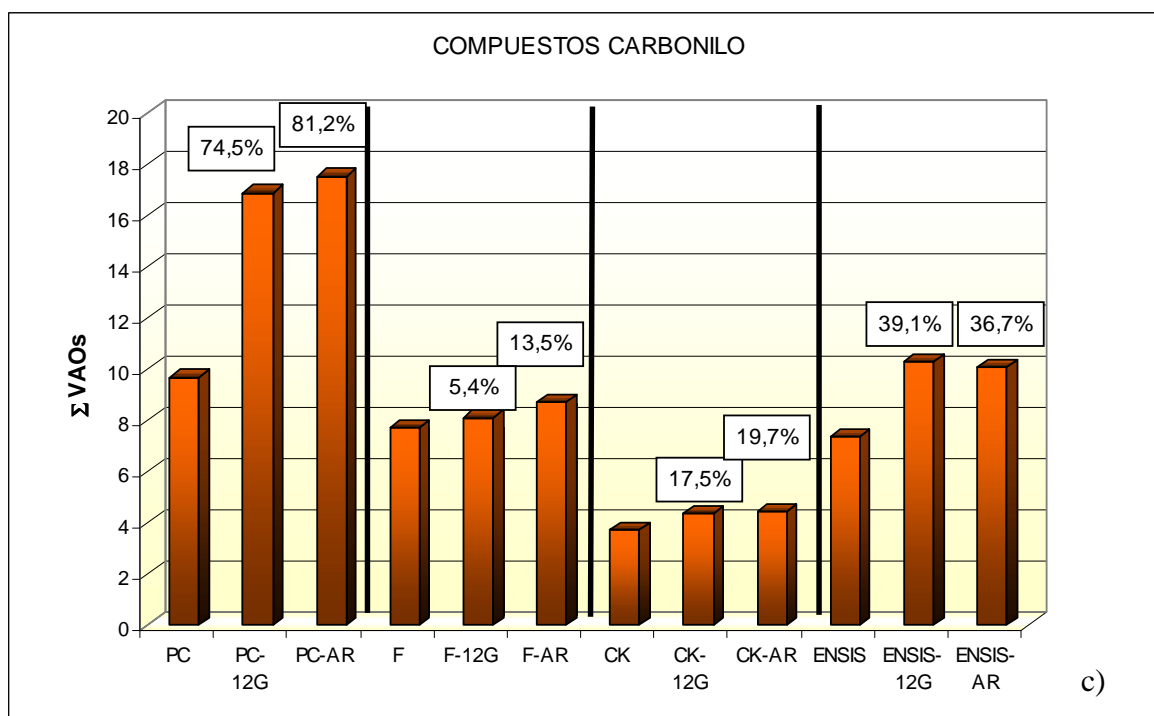


Fig.67. Influencia del preparado enzimático sobre los aromas “otros” (ΣVAOs compuestos carbonilo) de los vinos de *Moscatel de Alejandria* elaborados con distintas cepas de levadura

Para los vinos de *Moscatel*, se observa que también se produce una disminución del carácter afrutado con el tratamiento enzimático, mucho más acusado para el preparado AR 2000 (Fig. 66a). Esta disminución es a consecuencia de la hidrólisis de ésteres comentados en el apartado anterior y que afecta principalmente al acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Asimismo, se produce una disminución de acetato de feniletilo que también contribuye a una reducción de aromas pero, en este caso, de carácter floral.

Por otra parte, sin embargo, los aromas florales aumentan ligeramente contribuyendo al valor de aroma: el linalol y el cis-óxido de linalol, ambos liberados en mayor proporción usando el preparado Novoferm 12G.

Aunque, en la Tabla 51 se observaba que el uso de enzimas en los vinos de *Moscatel* sólo aumentaba el contenido de compuestos terpénicos cuando se elaboraban con la cepa PC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y al aplicar el extracto Novoferm 12G, los resultados encontrados con respecto a los VAOs muestran que en todos los casos se produce un aumento de los mismos con el empleo de enzimas en los vinos de *Moscatel*. Además, con el uso de Novoferm 12G, dicho aumento es más importante superando el 20% en todos los casos.

En la Fig. 67 se recogen los resultados obtenidos para el Σ VAOs de los compuestos carbonilo entre los cuales el acetaldehído presenta la mayor contribución. Los resultados obtenidos para los vinos de esta variedad son muy similares a los obtenidos para la variedad *Palomino*, observándose un aumento importante de su contribución al valor de aroma en los vinos elaborados con PC. Estos resultados ponen nuevamente de manifiesto que la cepa de levadura ejerce una importante influencia sobre el perfil aromático, de manera que los vinos elaborados con PC tienden a ajerezarse. El hecho de que los tratamientos enzimáticos produzcan la hidrólisis de ésteres y de que la producción de acetaldehído se incremente durante el tratamiento en estos vinos favorece aun más sus características comparables a los vinos de Jerez. En este caso, aunque realmente el tratamiento enzimático favorece la liberación de terpenos y su contribución al valor de aroma de los vinos, ésta es inferior a la pérdida aromas afrutados y ganancia de aromas “otros” determinados principalmente por el acetaldehído.

Desde el punto de vista del valor de aroma y, por tanto el perfil sensorial de los vinos determinado a partir de dicho valor, los tratamientos enzimáticos estudiados poseen actividades hidrolasas que disminuyen considerablemente el nivel de ésteres y su contribución al aroma. La actividad β -glucosidasa de estos extractos no parece ser suficiente ni encontrarse lo suficientemente pura como para mejorar el valor de aroma de los vinos.

V.4.4. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO

Los resultados del análisis sensorial (Fig. 68 y 69), mostraron que en todos los casos se produce una pérdida significativa de la calidad aromática que los catadores reflejaron como de falta de tipicidad. La intensidad aromática en algunos casos resultó mayor y los tratamientos enzimáticos con la cepa PC y en general con AR2000 dieron los peores resultados.

El color fue valorado en general como ligeramente más intenso en todos los casos, pero sin diferencias significativas ($p < 0,05$).

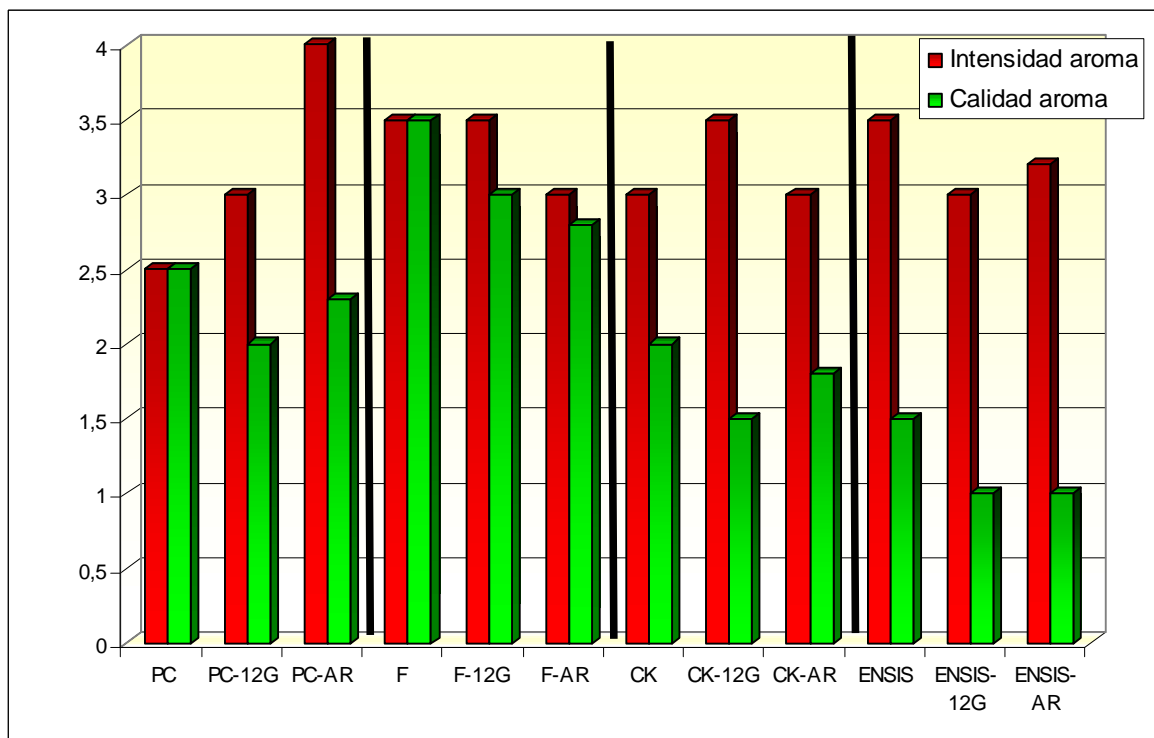


Fig. 68. Intensidad y calidad aromática de los vinos *Palomino fino* tratados con extractos enzimáticos frente a sus correspondientes testigos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

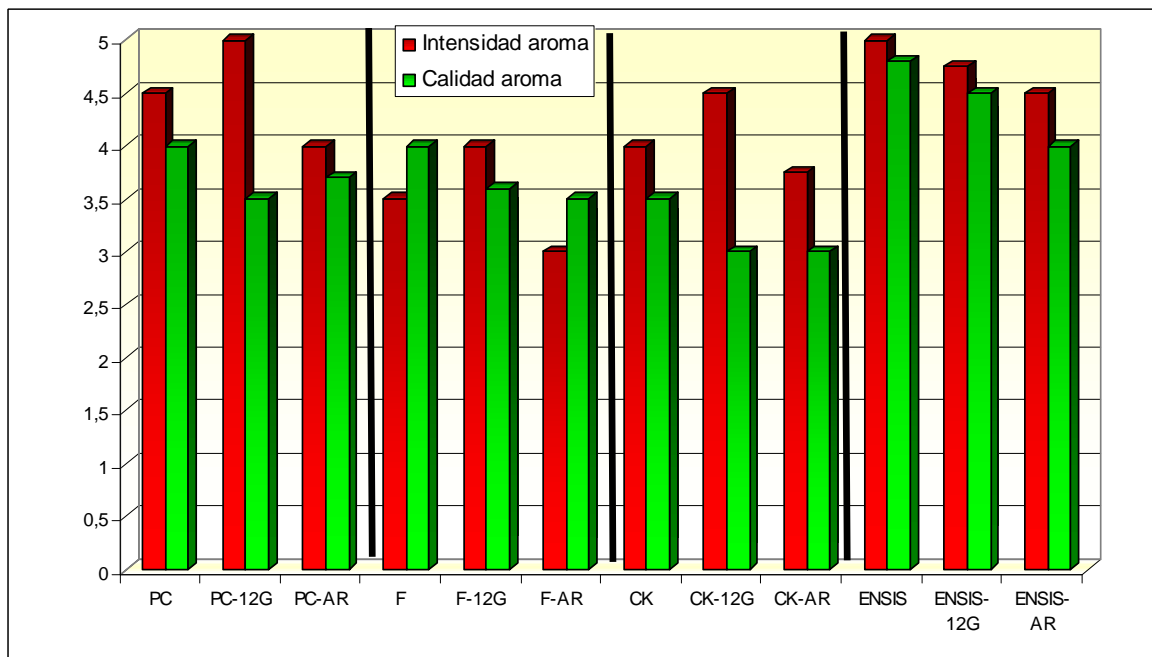


Fig. 69. Intensidad y calidad aromática de los vinos *Moscatel de Alejandria* tratados con extractos enzimáticos frente a sus correspondientes testigos

Como resultados más específicos, en los vinos de *Moscatel* se observó una pérdida de tipicidad con el empleo del extracto AR 2000 mientras que con el empleo de Novoferm 12G mejoró la intensidad aromática pero no así su calidad.

V.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS TÉCNICAS EMPLEADAS

Para determinar estadísticamente la existencia o no de diferencias significativas entre el perfil aromático de los vinos elaborados usando las distintas técnicas se procedió a realizar un “Análisis de Componentes Principales” usando como variables los VAOs obtenidos para cada vino.

Como se puede observar en la Tabla 53, del ACP aplicado a 21 variables VAO aromáticas en los vinos de la variedad *Palomino fino* se extraen dos factores que explican el 62% de la varianza total de los datos. El factor 1 (F1), con un 42,6% de la varianza explicada, agrupa a las variables que presentan mayor contribución al aroma del vino como los ácidos hexanoico y octanoico y los ésteres acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo además del 3-metil-1-butanol con signo positivo, y al pentanoato de etilo, 1-propanol, 2-metil-1-propanol y acetato de etilo con signo negativo. El factor 1 engloba por tanto a los aromas afrutados, encontrándose con signo negativo los que presentan menor contribución a dicho factor. Así, cuanto mayor sea F1 mayor es el contenido en ésteres y menor en alcoholes superiores, luego los vinos son más aromáticos.

Por otra parte, el factor 2 (F2) explica sólo el 19,4% de la varianza y agrupa principalmente a aquellas variables con características florales y herbáceas que contribuyen positiva (acetato de isoamilo) o negativamente (1-hexanol, 2-feniletanol y acetato de feniletilo) al perfil aromático según el tratamiento aplicado. Cuanto mayor es el factor 2 mayor contribución del acetato de isoamilo y menor de los aromas herbáceos como el 1-hexanol, luego los vinos resultan también más aromáticos y, sobre todo, más afrutados.

Representando las cargas factoriales F1 vs F2 de cada uno de los vinos (Fig. 70), se puede observar que éstos tienden a agruparse en función del tratamiento aplicado. Así, un primer grupo estaría formado por los vinos elaborados usando distintas cepas de levadura y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los mismos tratados mediante preparados enzimáticos. Estos vinos se caracterizarían por poseer carga negativa del factor 1 y una carga muy baja o también negativa del factor 2, lo que se traduce en vinos con bajo contenido en ésteres y mayores en alcoholes, luego serían vinos poco aromáticos o con características poco afrutadas comparados con los vinos sometidos a otros tratamientos.

Tabla 53. Resultados del Análisis Componentes Principales para los vinos de la variedad *Palomino fino* elaborados por diversas técnicas (cargas factoriales > 0,70000)

| Variable | Factor 1 | Factor 2 |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Hexanoico</i> | 0,96996 | 0,10192 |
| <i>Decanoico</i> | 0,65326 | -0,16467 |
| <i>Octanoico</i> | 0,93135 | -0,15228 |
| <i>Citronelol</i> | -0,18797 | 0,34087 |
| <i>1-hexanol</i> | -0,10752 | -0,80736 |
| <i>cis-3-hexen-1-ol</i> | 0,20670 | -0,54298 |
| <i>Alcohol feniletilo</i> | -0,10884 | -0,87056 |
| <i>Butirato de etilo</i> | 0,31061 | 0,62493 |
| <i>Acetato de isoamilo</i> | 0,54368 | 0,72574 |
| <i>Hexanoato de etilo</i> | 0,76060 | 0,46646 |
| <i>Octanoato de etilo</i> | 0,89210 | 0,19019 |
| <i>Decanoato de etilo</i> | -0,04996 | -0,10443 |
| <i>Succinato de dietilo</i> | 0,65755 | 0,00165 |
| <i>Pentanoato de etilo</i> | -0,76043 | -0,35356 |
| <i>Acetato de feniletilo</i> | 0,39596 | -0,78423 |
| <i>1-propanol</i> | -0,91029 | 0,02235 |
| <i>2-metil-1-propanol</i> | -0,87164 | 0,13178 |
| <i>2-metil-1-butanol</i> | 0,60720 | 0,29291 |
| <i>3-metil-1-butanol</i> | 0,71818 | 0,39518 |
| <i>Acetaldehído</i> | -0,71141 | 0,05985 |
| <i>Acetato etilo</i> | -0,83676 | -0,11456 |
| Exp. Var | 8,95191 | 4,07988 |
| Prp. Totl | 0,42628 | 0,19428 |

En el segundo grupo se engloba a los vinos elaborados utilizando la técnica de maceración pelicular, existiendo ligeras diferencias entre ellos. En todos los casos estos vinos presentan carga positiva del F1, que además aumenta con el tiempo de maceración, lo cual indica un alto contenido en ésteres que aumenta con el tiempo de maceración. Por otra parte, la carga F2 depende del tiempo de maceración, pero siempre presenta valores < 1 , luego la aportación del acetato de isoamilo es baja. Así, los vinos macerados poseen un carácter más afrutado que incluso los elaborados con las distintas cepas dado su mayor contenido en ésteres, destacando el macerado de 8 h que presenta también valores positivos de F2 y por tanto indica una mayor aportación del acetato de etilo y menor del 2-feniletanol, 1-hexanol y acetato de feniletilo.

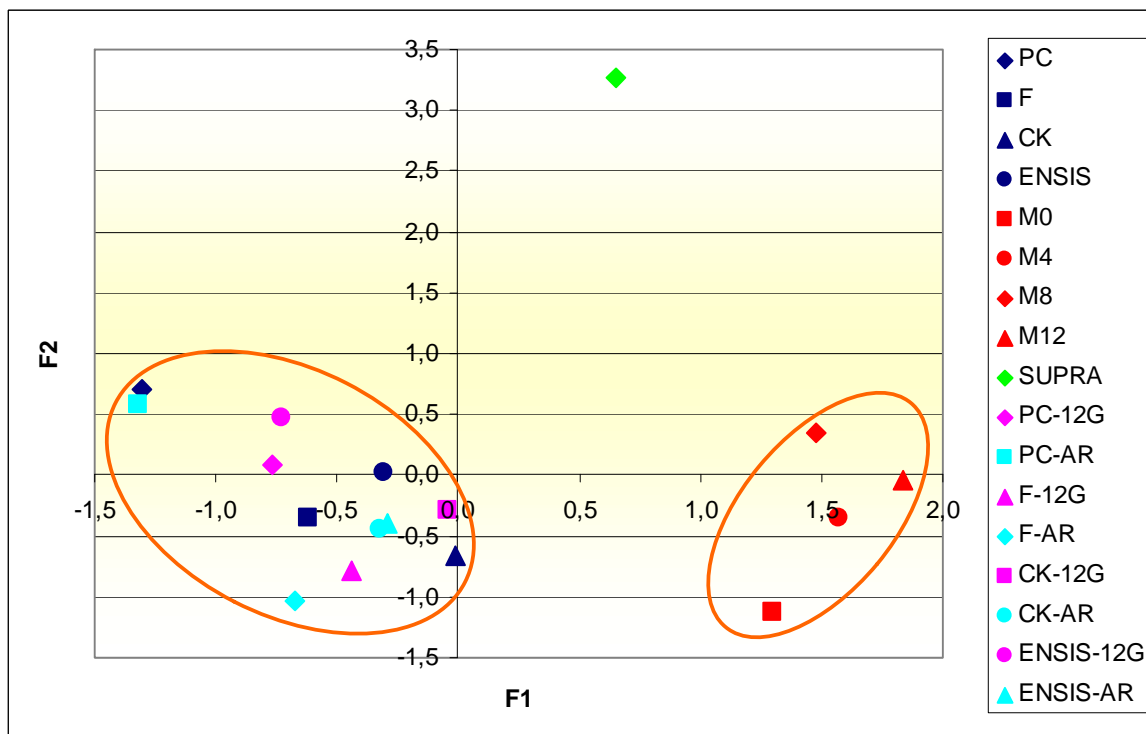


Fig. 70. Distribución de tratamientos en función de sus cargas factoriales (F1 vs F2) para los vinos

Palomino fino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por último hay que destacar que la técnica de supraextracción es la que produce vinos que se diferencian más del resto. En este caso la contribución de cada factor es siempre positiva presentando valores muy altos del F2. Hay que recordar que estos vinos presentaron valores de aroma muy altos para el acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo, lo cual contribuyó favorablemente a su evaluación sensorial. Por otra parte, y aunque no se han tenido en cuenta dichas variables para realizar la estadística de estos vinos, presentaron gran cantidad de terpenos con respecto a los testigos, no sólo aumentando considerablemente los niveles de citronelol sino también dando lugar a otros como el linalol, α -terpineol, nerol, hotrienol, etc.

Para los vinos de *Moscatel* (Tabla 54) se extraen también dos factores que explican el 54% de la varianza total de los datos. En este caso, el ACP se lleva a cabo con un total de 25 variables de aroma y el factor 1 explica el 39,1% de la varianza total mientras que el factor 2 explica el 14,9%.

Tal y como ocurría en los vinos de *Palomino*, el factor 1 engloba a las variables que presentan mayor contribución al aroma de los vinos *Moscatel*, entre los cuales se encuentran los compuestos terpénicos linalol, α -terpineol y citronelol, así como el 2-feniletanol (signo negativo), los ésteres hexanoato y octanoato de etilo y el 1-propanol. Así, un aumento de dicho factor indica una mayor contribución de los ésteres y terpenos, y por lo tanto de los aromas afrutados y florales. Al factor 2 contribuyen el decanoato de etilo y los alcoholes isoamílicos con signo positivo, lo cual indica una mayor contribución de dichos compuestos al aroma del vino. Cuanto mayor sea F2 mayor es la contribución de dichos compuestos pero eso influye negativamente en el aroma del vino.

Tabla 54. Resultados del Análisis Componentes Principales para los vinos de la variedad *Moscatel de Alejandría* elaborados por diversas técnicas (cargas factoriales > 0,70000)

| Variable | Factor 1 | Factor 2 |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Isovalérico</i> | -0,66490 | -0,21068 |
| <i>Hexanoico</i> | -0,54834 | -0,11917 |
| <i>Decanoico</i> | -0,11692 | 0,60264 |
| <i>Octanoico</i> | -0,58564 | 0,51558 |
| <i>Linalool</i> | 0,84778 | -0,16189 |
| <i>a-terpineol</i> | 0,73209 | -0,12349 |
| <i>Citronelol</i> | 0,94066 | 0,04347 |
| <i>Geraniol</i> | 0,47412 | -0,39791 |
| <i>Nerol</i> | 0,61115 | 0,56130 |
| <i>1-hexanol</i> | 0,35125 | -0,18110 |
| <i>cis-3-hexen-1-ol</i> | -0,55207 | 0,20882 |
| <i>Alcohol feniletilo</i> | -0,87468 | 0,16137 |
| <i>Butirato de etilo</i> | 0,60974 | -0,09136 |
| <i>Acetato de isoamilo</i> | 0,68047 | 0,07096 |
| <i>Hexanoato de etilo</i> | 0,87934 | 0,14308 |
| <i>Octanoato de etilo</i> | 0,85845 | 0,36452 |
| <i>Decanoato de etilo</i> | 0,15918 | 0,73499 |
| <i>Succinato de dietilo</i> | 0,68609 | -0,18692 |
| <i>Acetato de feniletilo</i> | -0,67516 | 0,32919 |
| <i>1-propanol</i> | 0,88343 | -0,12721 |
| <i>2-metil-1-propanol</i> | 0,43942 | 0,45467 |
| <i>2-metil-1-butanol</i> | -0,12202 | 0,73744 |
| <i>3-metil-1-butanol</i> | 0,02414 | 0,76836 |
| <i>Acetaldehído</i> | -0,68288 | -0,43539 |
| <i>Acetato etilo</i> | 0,06165 | 0,13430 |
| Exp. Var | 9,78650 | 3,72172 |
| Prp. Totl | 0,39146 | 0,14887 |

En la Fig. 71 se representa la contribución de cada factor a los vinos de *Moscatel* elaborados con las distintas técnicas. Como se puede observar, y al igual que ocurría con los vinos de *Palomino*, se establecen tres grupos claramente diferenciados. El primero el formado por los vinos elaborados con distintas cepas tratados o no con preparados enzimáticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dichos vinos se caracterizan por presentar valores del F1 bajos y, por tanto, con menores contribuciones de ésteres y terpenos lo cual se traduce en vinos con características poco afrutadas y florales. El factor 2 muestra bastante variabilidad, disminuyendo la contribución de los isoamílicos con los tratamientos enzimáticos.

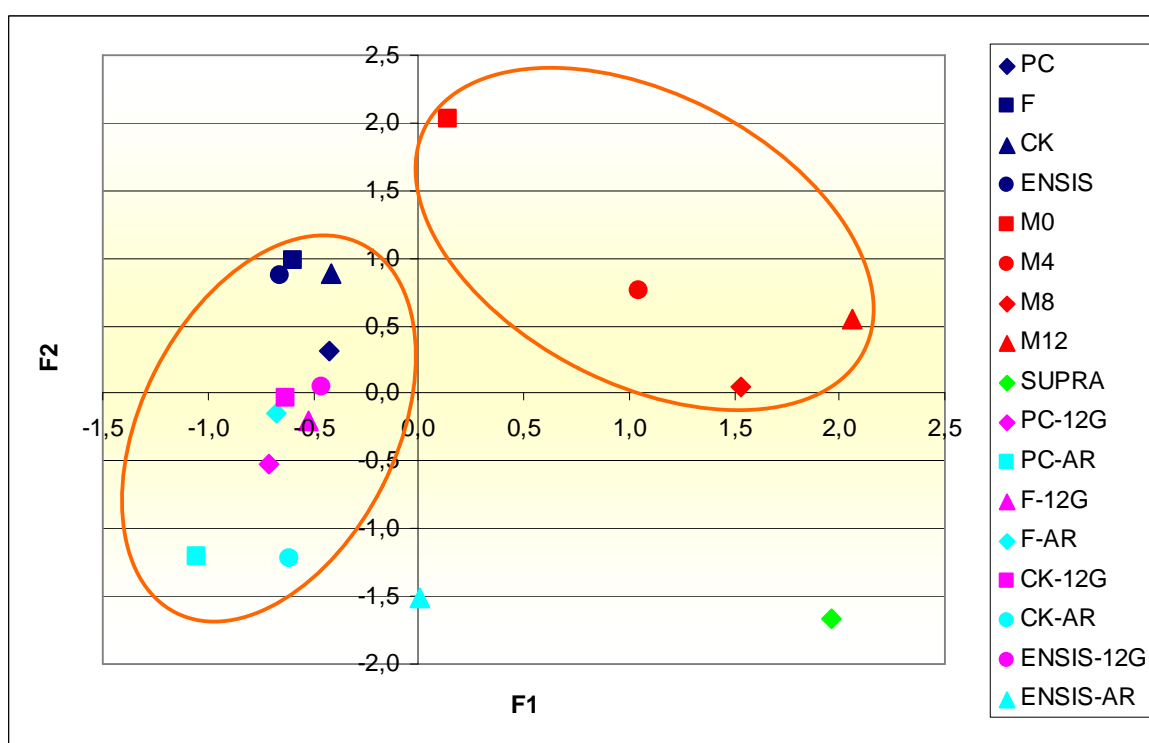


Fig. 71. Distribución de tratamientos en función de sus cargas factoriales (F1 vs F2) para los vinos *Moscatel de Alejandría*.

El segundo grupo es el que engloba a los vinos sometidos a maceración. La contribución de ambos factores es positiva, aunque se observa un aumento del F1 y una disminución del F2 con el tiempo de maceración, a excepción del M12, lo que indica una mayor contribución de los aromas afrutados y florales debida al aumento de ésteres y terpenos, y más baja de los isoamílicos. Los vinos de *Moscatel* macerados durante 8 horas son los que presentan mejor calidad aromática dentro de este grupo.

El tercer grupo constituido por los vinos obtenidos por la técnica de supraextracción. Al igual que ocurría con los vinos de *Palomino*, estadísticamente se separan del resto. Son los vinos que presentan mayor contribución del factor 1 y, por tanto, mayores valores de aroma para los compuestos positivos que agrupa. Por otra parte, la contribución del factor 2 es más baja, luego hay una menor contribución de los alcoholes isoamílicos al valor de aroma resultando vinos más ricos en aromas afrutados y florales.

Un aspecto importante a destacar para los vinos de ambas variedades es que el factor 1, que engloba a los ésteres y terpenos (en *Moscatel*) más importantes según la variedad, diferencia claramente las técnicas prefermentativas de las técnicas basadas en el empleo de cepas de levaduras, con más o menos capacidad de liberar aromas, y con el uso o no de extractos enzimáticos comerciales tras la fermentación. Queda claro, por tanto, que las técnicas prefermentativas, que favorecen la extracción de aromas tanto libres como glicosilados, juegan un papel muy importante en las características del producto final. Comparando los vinos M0 y F de ambas variedades y, teniendo en cuenta que la única diferencia entre ellos es la técnica de extracción del mosto (prensa neumática para M0 y prensa de placas horizontales para F), en las Fig. 70 y 71 se puede observar que M0 presenta siempre mayor carga de F1, luego en dichos vinos la contribución de ésteres y terpenos es más importante. Por otra parte, F2 también difiere indicando una mayor aportación de terpenos y menor de hexanol en los vinos de *Palomino* y una mayor contribución de los isoamílicos en los de *Moscatel*. Estos resultados indican que el prensado es también un elemento clave en el proceso de vinificación, favoreciéndose la extracción/liberación de aromas con el uso de prensas neumáticas, como se puede observar en nuestros ensayos. En las Fig. 70 y 71, se puede observar que los vinos fermentados con la cepa F y los testigos de maceración pelicular (M0), también fermentados con la cepa F, muestran características sensoriales distintas y se separan también en el estudio estadístico agrupándose los M0 con los vinos más aromáticos. Cabe resaltar sin embargo, que las diferencias observadas en los vinos de *Palomino* son más importantes que las observadas en los de *Moscatel*, lo que estaría relacionado también con el carácter más aromático de esta última.

**VI. USE OF *Trichoderma* ENZYMATIC EXTRACTS ON VINIFICATION OF
Palomino fino GRAPES IN THE SHERRY REGION**

A. ROLDÁN*, V. PALACIOS, X. PEÑATE, T. BENÍTEZ and L. PÉREZ

Journal of Food Engineering 75:375-382, 2006

ABSTRACT

The influence of *Trichoderma* hydrolytic enzymes, with pectinase, cellulase, chitinase and/or glucanase activities, the supraextraction and the health stage of *Palomino fino* grape on juice clarification, fermentation process and the final characteristic of young wine were studied. The effect of enzymatic preparation on juice clarification depended of the grape sanitary stage (healthy or infected) and on the system applied to obtain the juice (frozen or fresh juices of grapes). The highest effectivity was showed with the use of enzymes in infected juice. The fermentation kinetics were not affected by the enzymatic preparations although a decrease in turbidity (below 20 NTU) was noted. Also, the highest differences in the wine characteristic were detected when comparing wines from juices subjected to different conditions (healthy of infected, frozen or fresh) independently of enzymes use. Supraextracted juices gave rise to wines with increased acidity and higher alcohols such as methanol, propanol and isobutanol.

KEY WORDS: *Trichoderma* enzymes, *Palomino fino* grapes, sherry young wine, juice decantation, fermentation kinetic, supraextraction

INTRODUCTION

The Jerez area has traditionally been involved in high quality sherry wine production. Together with the specific edaphic conditions and climate, what stands out in the production process is the biological (fino sherry), physico-chemical (oloroso sherry) or a mixture of both processes (amontillado sherry) aging by the solera system (Martínez de la Ossa, Caro, Bonat, Pérez and Domecq, 1987a, Martínez de la Ossa, Pérez and Caro, 1987b). This aging has motivated for vineyards to be formed that are almost exclusively *Palomino fino* grape variety for the idoneous kind of grape for sherry elaboration (Puertas, 1989).

Different procedures applied during the harvest and storage of the grapes, different fungal enzymatic preparations obtained from commercial sources or from *Trichoderma* strains have been added to enhance the decantation process. This rationale is based on the fact that the cell wall components slow down decantation and may retain aromatic compounds (Pretorius, 2000). These components, mainly pectin content depend on the grape variety, maturity and the technology used in the wine production (Pretorius, 2000, Visser and Voragen, 1996). Pectin makes the settling of particles and the clarification very slow. Pectinases are the enzymes with the most important technological effects. They enable the increase of the free run juice volume by decreasing its viscosity, and improve the clarification of the juice and the wine filtration. In association with cellulases, glucanases and hemicellulases, pectinases speed up the natural process of winemaking and improve the quality of the wine (Rhem and Reed, 1996, Visser and Voragen, 1996).

Enzymes being the grape and the yeast release the aromatic compounds of juice during fermentation (González, Ramón and Pérez-González, 1992). This can also be achieved by exogenous commercial enzymes (Visser and Voragen, 1996) principally from the fungus *Aspergillus niger* which contain pectinases and glycosidases that release the major part of terpenols and lead to more fruity and aromatic wines.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

However, commercial enzymes used in winemaking are mixtures containing different amounts of pectin esterases, polygalacturonases, pectin lyases and minor of hemicellulases, cellulases and other activities. Their exact nature and ratios have not yet been established which may be crucial in obtaining optimal performance in winemaking (Harman and Kubicek, 1998). Preparations higher in pectin lyase than in pectin methyl esterase are preferred so that methanol liberation from methylated polygalacturonic acid is minimized (Harman and Kubicek, 1998), but these preparations have a limited effect in the improvement of problematic juices such as obtained from *Botrytis cinerea* infected grapes. In this case, *Trichoderma* B-glucanases could be successfully used in the processing of wine (Dubordieu, Desplanques, Villettaz and Ribereau-Gayón, 1985, Harman and Kubicek, 1998). However, significant and reproducible improvement is therefore obtained only with a correct balance of exogenous activities added to complement the poor endogenous enzyme activities of the grape. This balance is found by experimenting with various enzyme mixtures. Some positive results have been obtained using a macerating enzyme preparation having a blend of activities (pectinases, cellulases, hemicellulases) from *Trichoderma* and *Aspergillus* over four successive vintages (Harman and Kubicek, 1998). Alternatively other authors have suggested that to speed juice extraction producing aromatic compounds, yeast can increase the liberation of varietal aroma by producing enzymes that hydrolyze both grape cell walls and the aromatic precursors in the grape juice (Dequin, 2001, Nevoigt et al., 2002, Ostergaards, Olsson and Nielsen, 2000).

In this work, the influence of *Trichoderma* hydrolytic enzymes on the supraextraction and the health stage of *Palomino fino* grape on juice clarification and fermentation process and the final characteristic of young wine were studied.

MATERIALS AND METHODS

Strains: *Trichoderma harzianum* Rifai strain CECT 2413 and *Trichoderma reesei* strain CECT 2414 were obtained from Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, Spain

(Dawson, Belloch, García-López and Uruburu, 1990). They were maintained on PPG agar medium (Limón, Pintor-Toro and Benítez, 1998). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain isolated in Bodegas Domecq, S.A., Jerez de la Frontera, Spain (PDC strain) was used to carry out *Palomino fino* juice fermentations.

Enzymatic preparations and determination of enzymatic activities: A two-step culture was used to produce enzymatic extracts from minimal media supplemented with different carbon sources. *T. harzianum* and *T. reesei* were grown in Czapeck salt minimal medium supplemented with 2% glucose and then filtered mycelia were resuspended in 10 L containers with 5 L of the same minimal medium with either 0.5% crabshell chitin for *T. harzianum* cultures or 0.5% cellulose or 0.5% citrus pectin for *T. reesei* cultures, instead of glucose (Limón et al, 1998). The cultures were incubated for 3 to 5 days with magnetic stirring, following procedures described (Limón et al, 1998). The cultures were then filtered and the supernatants were brought to 80% saturation with ammonium sulfate. The resultant precipitates were collected and dialyzed and the extracts lyophilized and kept for further protein and enzyme analysis, according to procedures described (Limón et al, 1998).

Determination of dry weight and protein content present in the extracts, as well as protease, chitinase, cellulase, B-1,3-glucanase, B-1,6-glucanase, polygalacturonase, pectate lyase and pectin methyl esterase activities were measured following procedures already described (De la Cruz et al, 1993, García-Maceira, 2000).

Juice preparation procedures: Samples of *Palomino fino* grapes were taken in the Jerez-Xérèz-Sherry D.O. wine production area. They were used in all the assays carried out, although their characteristics varied according to their sanitary state and the way the grapes were kept after being harvested and/or pressed: Healthy Juice (HJ) corresponded to juice obtained from healthy grapes once pressed; Infected Juice (IJ) referred to juice obtained from *Botrytis cinerea* infected grapes; Frozen Juice (FZJ) was the juice obtained from healthy grapes and kept frozen until its utilization; Juice from Frozen Grapes (JFG) was the juice obtained from

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

healthy grapes that were frozen after the harvest and kept frozen until their use for juice extraction once thawed (supraextraction). The samples collected, either fresh or frozen, were pressed mechanically to extract the juice. The sugar content oscillated between 11 to 12° Be and the total acidity oscillated between 5 to 8 g/L tartaric acid. Before decantation to eliminate solids in suspension, the juices were corrected for acidity to pH 3.2. to 3.3 and 80 mg/L SO₂ were added.

After the grape pressed juices were obtained, 6 samples of 3 L each were taken for each assay carried out. The samples were placed into 5 L glass containers and the enzymatic preparations obtained from *Trichoderma reesei* grown in pectin- (E1) (10 mg), or cellulose- (E2) (40 mg), or *Trichoderma harzianum* grown in chitin-supplemented minimal media (E3) (25 mg), as well as two fungal commercial extracts, Ultrazym 100 G (E4) (10 mg), and Novoclaizym FCE G (E5) (2.5 mg) a pectolytic enzyme preparation used for juice decantation were added. Different amounts of each extract were added to get the same or near the same final enzyme units as the ones recommended in the commercial preparations. Controls with no enzymes added were also carried out (TG).

Once the enzymatic preparations were homogeneously distributed, the juice of each glass container was newly divided into two 2 containers to carry out the experiments in duplicate. The containers were maintained at room temperature (20 to 22° C) for 24 h to allow decantation of the juices to occur. The cleared juices were transferred to new glass containers and subjected to a direct fermentation by inoculating (in duplicate). During fermentation the alcohol content (by the decrease in density of the juice) and increase in cell biomass (by re-count) were determined every day to follow fermentation kinetics. After the fermentation process was completed, wines were clarified by storage at 4°C for one week, the solids were removed, and the wines were maintained at the same conditions until the analytical and sensorial analyses were carried out.

Physico-chemical analyses: The turbidity (NTU) was determined with a 2100AN turbidimeter (Hach). The density was determined with a densitometer (Atom-Paar). The pH was determined with a pH-meter Crison 2001. The titratable acidity was determined by titration according to the method of the American Society of Enologists (Office International de la Vigne et du Vin, 1978). The alcoholic content was determined by distillation and later density meter. The volatile acidity was determined by the García Tena method (Métodos Oficiales de Análisis, 1976). Absorbances at 420, 340 and 280 nm were determined with a UV-visible spectrophotometer (Perkin-Elmer 200, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). And Na^+ and K^+ cations were measured by atomic absorption with a Pye Unicam SP9 atomic absorption spectrophotometer.

Glycerol and organic acid determination: The organic acids (citric, tartaric, malic, succinic and lactic acids) and glycerol were determined, in samples previously filtered, by HPLC in a Waters chromatograph. The chromatographic conditions were: a ION 300 column prewarmed at 50° C, a mobile phase of 0.005 M H_2SO_4 , a 0.3 mL/min flux and 60 min chromatogram time. A PDA detector at 210 nm to determine organic acids and a refraction index to determine glycerol respectively, were used.

Volatile compound determinations: Volatile compounds (acetaldehyde, di-acetylene, ethyl-acetate, methanol, n-propanol, isobutanol, isoamyl-acetate, 2-methyl-butanol and 3-methyl-butanol) were determined by gas chromatography, through direct injection of distilled samples using 4-methyl-2-pentanol as an internal standard. The chromatographic conditions used were a Carbowax 20 column (50 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm), 250° C injector, 250° C detector and H_2 as carrier gas; the temperatures programmed were 35° C for 10 min, 4° C/min (200° C) and 200° C 5 min.

Terpenes determination: To determine terpenes (terpineol, linalool, citronellol, nerol and geraniol), an extractive procedure in solid phase as a preconcentration technique was first applied, previous to terpene analysis by gas chromatography. To do so 600 mg Sep-Pack C18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

were pre-treated in the following way: 5 mL methanol, 5 mL bi-distilled water and 25 mL sample were mixed and the remaining water was eliminated by bubbling N₂. The terpenes were then extracted with 5 mL of di-ethyl-ether. The chromatographic conditions were an MFE-1000 column (50 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm, 250° C injector, 275° C detector, H₂ as carrying gas and the programmed temperatures were 80° C for 1 min, 4° C/min to 200° C, and 200° C for 20 min. 2-octanol was used as internal standard.

Sensorial analyses: The final products (young wines) obtained from each of the fermentations carried out were assessed by five professional testers with regards to their organoleptic properties, mostly color and aromatic features. Precisely, they were asked to indicate the most significant features shown by each wine and those features which may differentiate wines from each others. The main parameters to be considered were wine color, intensity, acidity, intensity of aromas, and aroma differences between floral, fruity and herbaceous.

Statistical analyses: Results of the physico-chemical analyses were processed with the statistical program STATWIN 4.0. A cluster analysis was carried out in order to establish whether or not the different wines could be gathered according to the treatment to which they had been subjected (different procedures for juice formation, addition or not of enzymatic preparations etc.).

RESULTS AND DISCUSSION

Extracts enzymatic activities: Supernatants from *Trichoderma* strains cultures, once precipitated, dialyzed and lyophilized (Ait-Lahsen, Soler, Rey, de la Cruz, Monte y Llobell, 2001) were weighed, and enzyme and protein determinations were further carried out. Data shown are averages of three experiments with standard deviations of less than 5%. Dry mass obtained were 850 mg from the pectin supplemented medium, with a protein content of 9.4%; the cellulose-supplemented media produced 150 mg of dry mass, and its protein content was

8.1%; finally, the chitin supplemented media gave rise to 250 mg dry mass and a protein content of 5.1%. Table 1 shows the enzymatic activities detected in the supernatants of *Trichoderma* strains grown in chitin (CHS) (E3), pectin (PCS) (E1) and cellulose (CLS) (E2) supplemented media. Whereas PCS and CLS enzyme preparations possess pectate-lyase, cellulase and B-1,3-glucanase activities, CHS lacks pectinases. Instead, CHS had B-1,3 and B-1,6 glucanase, protease and chitinase activities (Table 1). PCS and CLS seemed to be better enzyme preparations than CHS to be added to juices. In addition, no pectin-methyl-esterase activity was detected in any enzymatic preparation.

Table 1. Enzymatic activities^(a) detected in the lyophilized supernatants of *Trichoderma* strains, grown in minimal medium supplemented with either pectin (E1), cellulose (E2) or chitin (E3)^(b, c)

| ACTIVITY | E1 | E2 | E3 |
|------------------------|-------|-------|-------|
| Pectate lyase | 0.045 | 0.004 | 0.000 |
| Polygalacturonase | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Pectin methyl esterase | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Cellulase | 0.112 | 0.479 | 0.000 |
| β -1,3-glucanase | 0.055 | 0.214 | 0.413 |
| β -1,6-glucanase | 0.000 | 0.039 | 0.483 |
| Protease | 0.000 | 0.000 | 0.115 |
| Chitinase | 0.000 | 0.000 | 0.102 |
| Xylanase | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

(a) Activity is expressed as nmol/min/ μ g dry mass. Results are the average of three experiments in triplicate, with standard deviations of less than 5%

(b) The protein content was 9.4% (E1), 8.1% (E2) and 5.1% (E3) dry mass

(c) The commercial enzyme preparations Novoclaizym (E4) and Ultrazym (E5) have polygalacturonase (0.302 and 0.029 respectively) and cellulase (0.080 and 0.082 respectively) activities. E5 also has xylanase activity (0.752), defined as in (a)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Effects on juice decantation: As can be observed in Table 2, the initial turbidity varied enormously in the different juices. The juices infected with *B. cinerea* (IJ) displaying the highest values. This result already indicates that the solid content varied according to the sanitary stage of the grapes and the storage and extraction procedures that had been applied to the juices. Due to this initial variability, the effectiveness of the static decantation was also highly variable, as indicated by comparing decantation of the juices with no enzymes added (TG). In all juices except that infected with *B. cinerea* (IFJ), turbidity decreases rapidly, reaching values of 200 NTU or lower. Therefore, static decantation is effective enough in all cases, with acceptable values (50 to 200 NTU final turbidity values) (Dubordieu and Ollivier, 1989, Visser and Voragen, 1996), except IFJ, where a high concentration of solids, and of B-glucans (Dubordieu et al., 1985) have been liberated to the media, impeding clarification.

Table 2. Effects of enzyme preparation on turbidity (NTU) of the different juices after decantation.

| Enzyme preparations | HJ ^(a) | FZJ ^(b) | JFG ^(c) | IJ ^(d) |
|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | (1900 NTU)* | (1795 NTU)* | (311 NTU)* | (2500 NTU)* |
| E1 | 73 | 32 | 215 | 178 |
| E2 | - | 35 | 218 | - |
| E4 | 87 | 36 | 25 | 229 |
| E5 | 71 | 34 | 19 | 168 |
| Tg | 76 | 34 | 218 | 494 |

(a) HJ, juice from healthy grapes; (b) FZJ, frozen juice from healthy grapes; (c) JFG, juice from frozen healthy grapes (supraextraction); (d) IJ, juice from fresh grapes infected with *B. cinerea*

* Data in parenthesis indicated initial turbidity

The role that enzymatic preparations play on juices also depends on the procedure applied to each juice specifically. No differences were detected when comparing the addition of E1, E2, E4, E5 and the control with no enzymes added (TG) to fresh (HJ) or frozen juices (FZJ) obtained from healthy grapes. A significant positive effect on juice clarification was observed with enzymatic commercial preparations (E4 and E5) added to juice obtained from

frozen grapes (supraextraction) (JFG), and with *Trichoderma* (E1 and E2) and commercial (E4 and E5) enzymatic preparations when they were added to juices infected with *B. cinerea* (IFJ). This mold attacks nearly-ripe grapes producing a high molecular weight colloidal polysaccharide, a B-1,3-glucan with short side chains linked through B-1,6-bonds, that causes great difficulties in wine filtration (Dubordieu et al., 1985, Harman and Kubicek, 1998). The presence of glucanase activities in E1 and E2 may be partly responsible for the positive effect detected in the IFJ juice decantation. Glucanases of E1 and E2 enzyme preparations may also help to hydrolyze other glucans such as those from lysed yeasts that can also cause serious clarification and filtration problems (Harman and Kubicek, 1998). Both in JFG and IFJ, E5 commercial enzyme preparation showed the highest effectivity, followed by the second commercial enzyme preparation used, E4. As indicated in Materials and Methods, E5 is a mixture of pectinases and cellulases used to clarify juices and E4 is a mixture of the former enzymes plus xylanases used to liberate aromatic compounds.

Effects on fermentation kinetics: Preliminary results obtained after adding the E3 enzymatic preparation to juice gave rise to a slight delay in fermentation, and above all, a decrease in the final yeast cell number as compared to the control with no enzymes added (IG) (data not shown).

Enzyme preparations may have a direct negative effect on yeasts due to the presence of glucans as components of the yeast cell walls (Dequin, 2001, Pretorius, 2000), and an indirect effect due to the removal of essential nutrients during solid precipitation (Martínez, Valcárcel, Pérez and Benítez, 1998). To detect any of these possible effects of fungal hydrolytic preparations on yeasts during fermentation, frozen juice (FZJ) and juice from frozen grapes (JFG) were chosen. FZJ was selected because apparently there does not seem to exist major differences in this juice prior and after decantation; JFG (supraextraction) was selected because after adding the commercial enzyme preparations E4 and E5, the final turbidity reached was far too low (Table 2) and therefore the juice may be low-nutrient and not suitable in order to get appropriate fermentation kinetics (Visser and Voragen, 1996). Low

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nutrient juices give rise to a delay in the start of fermentation, the fermentation may take a long time or it ever may stop (Pretorius, 2000), so that turbidity not lower than 100 to 150 NTU is desirable to allow a good alcoholic fermentation (Visser and Voragen, 1996). However, when JFG (supraextraction) was fermented, the lag period was shorter and the yeast growth rate slightly higher than those parameters in FZJ (Table 3). It may happen that during freeze and thawed of JFG, grape cell walls get very seriously damaged, liberating higher amounts of cell components (González et al., 1992) that become nutrients for the yeast cells. Furthermore, the addition of the commercial enzyme preparations E4 and E5 to JFG reduces considerably the NTU value, below advisable values (Table 2). However, neither delay in the start of fermentation nor decrease in the rate of fermentation as compared to the juice with no enzymes added (Tg) was observed (Table 3), indicating that soluble nutrients that have not been removed during decantation are present in concentrations appropriated to allow optimal fermentation kinetics.

Table 3. Effects of enzyme preparation on fermentation kinetics

| Enzyme Preparations | Lag phase (days) | | Growth rate (h ⁻¹) | |
|---------------------|------------------|-----|--------------------------------|-------|
| | FZJ | JFG | FZJ | JFG |
| E1 | 2.3 | 1.8 | 0.264 | 0.329 |
| E2 | 2.3 | 1.8 | 0.274 | 0.334 |
| E4 | 1.4 | 1.8 | 0.259 | 0.326 |
| E5 | 2.3 | 1.8 | 0.261 | 0.326 |
| Tg | 2.3 | 1.7 | 0.264 | 0.341 |

FZJ: frozen juice from healthy grapes; JFG: fresh juice from frozen healthy grapes (supraextraction)

The presence of hydrolytic enzymes such as pectinases and cellulases may also liberate and solubilize pectic, cellulosic, and other monomers and oligomers (Visser and Voragen, 1996) which could be assimilated by the wine yeasts as carbon, nitrogen and/or energy sources, to carry out the fermentation under optimal conditions. In support of this suggestion, Varela et al. (Varela, Calderón, Suárez and García, 1997) already reported that addition of commercial enzymes (E4 and E5) to juices gave rise to a decrease in the total nitrogen content present in the juices, but almost no variation was observed in either the concentration of aminic nitrogen or in that of easily assimilable nitrogen sources.

Effects on wine physico-chemical characteristics: The effects of adding fungal hydrolytic enzymes to juices on the properties of the wines finally obtained, after juice fermentation and clarification, were studied in the frozen juices (FZJ) and juices obtained from frozen grapes (JFG) (supraextraction) and the results obtained were subjected to statistical analyses. Applying a cluster analysis (Fig. 1), in which it was taken into account all the parameters that were analysed in the wines, it was observed that wines obtained from juices with different characteristics (healthy versus infected, fresh versus frozen, etc.) can be gathered into two blocks, independently of whether or not fungal enzymes were added or the origin (commercial, obtained in the laboratory) of these enzyme preparations.

Also, when the average values (obtained from the different parameters analyzed among the enzymes of each group, reflected in the cluster analysis) were compared, significant differences were detected between the two blocks (Table 4). Juices obtained from frozen grapes (JFG) (supraextraction) possess a substantial increase in total acidity with regards to the remaining juices. This increase in acidity is the result of the high content of organic acids, mainly citric and malic acids present in these juices. In addition, higher Na^+ and K^+ concentrations and glycerol, lower ethanol, and significantly higher concentrations of methanol, n-propanol and iso-butanol, and lower concentrations of acetaldehyde, ethyl acetate and isoamyl acetate were also detected. Supraextraction, resulting from grapes which have been first frozen and then thawed, produces very seriously damaged skin tissues. Compounds

very relevant for wine color and aroma such as polyphenols, organic acids or cations are present mostly in the skin (Harman and Kubicek, 1998, Visser and Voragen, 1996), and the supraextraction procedure allows all these compounds to be liberated from the skin, contributing to wine color and aroma. On the other hand, more pectins and pectic oligomers are extracted from the cell tissues formed mostly by cellulose and pectins (Visser and Voragen, 1996). Pectin and pectic oligomers are induced and substrate of the pectolytic system, among them pectin methyl esterases, which would act on pectic residues liberating methanol. Similarly, nitrogenous residues are liberated from damaged skins in great amounts. These compounds are precursors of higher alcohols such as iso-butanol and n-propanol, decreasing the concentration of other alcohols such as isoamyl-alcohol (González et al., 1992, Pretorius, 2000).

Figure 1. Diagram of cluster

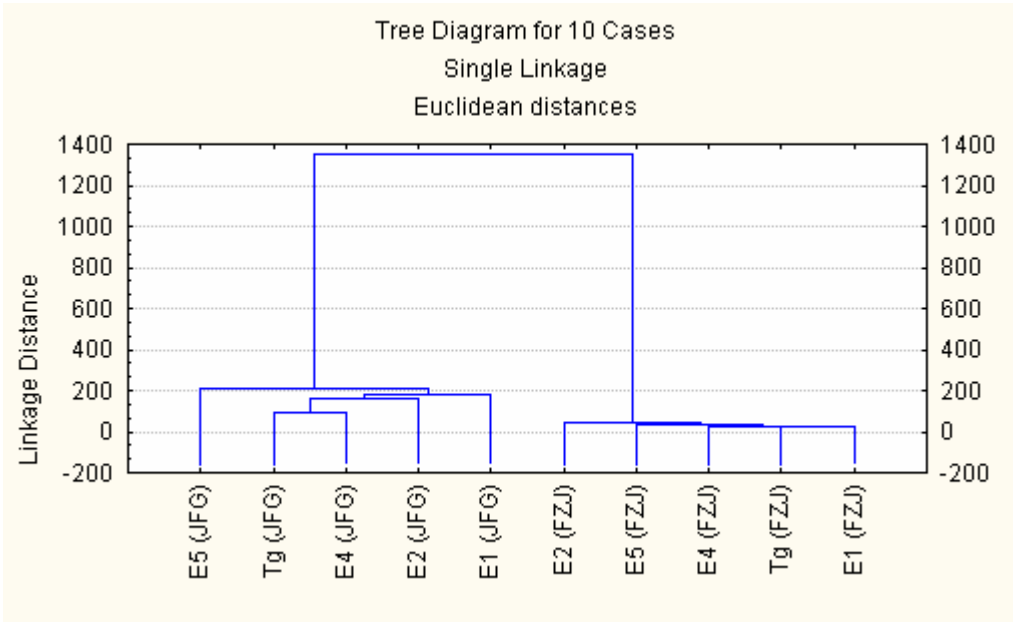


Table 4. Parameters measured in FZJ and JFG (average values \pm standard deviations) (n=10)

| | FZJ | JFG |
|---------------------------|---------------------|----------------------|
| Density | 0.9893 \pm 0.0001 | 0.9922 \pm 0.0001 |
| pH | 3.05 \pm 0.07 | 2.94 \pm 0.01 |
| Ethanol %v/v | 12.0 \pm 0.1 | 10.9 \pm 0.2 |
| AT (g/L TH ₂) | 5.39 \pm 0.08 | 7.90 \pm 0.01 |
| AV (g/L AcH) | 0.42 \pm 0.08 | 0.19 \pm 0.03 |
| Absorbance A420 | 0.095 \pm 0.004 | 0.115 \pm 0.006 |
| Absorbance A320 | 2.620 \pm 0.035 | 1.275 \pm 0.042 |
| Absorbance A280 | 2.605 \pm 0.007 | 2.880 \pm 0.007 |
| Na | 13.12 \pm 1.53 | 82.95 \pm 10.05 |
| K | 639.20 \pm 10.05 | 2225.00 \pm 220.92 |
| Glycerol (g/L) | 5.64 \pm 0.37 | 6.76 \pm 0.21 |
| Citric acid (mg/L) | 113.56 \pm 0.22 | 443.00 \pm 0.32 |
| Tartaric acid (g/L) | 3.32 \pm 0.22 | 4.53 \pm 0.25 |
| Malic acid (mg/L) | 211.22 \pm 0.12 | 547.20 \pm 25.57 |
| Succinic acid (g/L) | 1.03 \pm 0.09 | 2.25 \pm 0.06 |
| Lactic acid (g/L) | 1.15 \pm 0.28 | nd |
| Acetaldehyde (mg/L) | 105.47 \pm 4.49 | 58.16 \pm 14.84 |
| Ethyl acetate (mg/L) | 23.78 \pm 1.64 | 20.73 \pm 4.48 |
| Diacetylyle (mg/L) | 3.93 \pm 0.78 | 5.32 \pm 1.63 |
| Methanol (mg/L) | 31.73 \pm 2.30 | 40.69 \pm 2.20 |
| n-propanol (mg/L) | 15.55 \pm 0.61 | 31.37 \pm 1.56 |
| Iso-butanol (mg/L) | 19.43 \pm 0.21 | 36.06 \pm 2.86 |
| 2-methyl butanol (mg/L) | 27.17 \pm 1.27 | 18.79 \pm 3.77 |
| 3-methyl butanol (mg/L) | 136.64 \pm 3.45 | 108.27 \pm 19.01 |
| Terpenes (mg/L) | 2.14 \pm 0.92 | 2.54 \pm 0.52 |

nd: non detected; FZJ, frozen juice from healthy grapes; JFG, fresh juice from frozen healthy grapes
(supraextraction)

Table 5. Composition of wines obtained from JFG treated with different enzyme preparations, or with no enzymes added (TG) (average values \pm standard deviations)

| | Commercial (n=4) | <i>Trichoderma</i> (n=4) | TG (n=2) |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| Density | 0.9923 \pm 0.0001 | 0.9922 \pm 0.0001 | 0.9923 \pm 0.0001 |
| pH | 2.95 \pm 0.003 | 2.94 \pm 0.003 | 2.95 \pm 0.001 |
| Ethanol %v/v | 10.8 \pm 0.3 | 11.1 \pm 0.1 | 10.8 \pm 0.0 |
| AT (g/L TH ₂) | 7.90 \pm 0.00 | 7.90 \pm 0.00 | 7.87 \pm 0.00 |
| AV (g/L AcH) | 0.187 \pm 0.001 | 0.217 \pm 0.001 | 0.155 \pm 0.035 |
| Absorbance A420 | 0.113 \pm 0.001 | 0.110 \pm 0.011 | 0.112 \pm 0.004 |
| Absorbance A320 | 1.315 \pm 0.010 | 1.268 \pm 0.02 0 | 1.220 \pm 0.008 |
| Absorbance A280 | 2.885 \pm 0.001 | 2.877 \pm 0.010 | 2.874 \pm 0.019 |
| Na | 80.6 \pm 0.78 | 76.87 \pm 5.90 | 99.80 \pm 17.68 |
| K | 2414.7 \pm 148.8 | 2019.0 \pm 123.04 | 2257.5 \pm 77.07 |
| Glycerol (g/L) | 6.81 \pm 0.24 | 6.60 \pm 0.11 | 7.0 \pm 0.03 |
| Citric acid (mg/L) | 443.00 \pm 0.03 | 417.00 \pm 0.02 | 490 \pm 0.03 |
| Tartaric acid (g/L) | 4.78 \pm 0.04 | 4.37 \pm 0.04 | 4.56 \pm 0.13 |
| Malic acid (mg/L) | 533.00 \pm 0.01 | 570.00 \pm 0.03 | 530.00 \pm 0.00 |
| Succinic acid (g/L) | 2.28 \pm 0.06 | 2.19 \pm 0.01 | 2.31 \pm 0.09 |
| Acetaldehyde (mg/L) | 43.58 \pm 19.26 | 68.51 \pm 6.60 | 66.60 \pm 0.41 |
| Ethyl acetate (mg/L) | 16.87 \pm 1.22 | 25.51 \pm 0.19 | 18.90 \pm 3.91 |
| Diacetyl (mg/L) | 3.70 \pm 0.73 | 5.95 \pm 0.39 | 7.30 \pm 0.06 |
| Methanol (mg/L) | 39.84 \pm 2.50 | 41.92 \pm 2.85 | 39.94 \pm 1.29 |
| n-propanol (mg/L) | 32.27 \pm 0.95 | 31.77 \pm 0.39 | 28.78 \pm 1.05 |
| Iso-butanol (mg/L) | 38.57 \pm 2.28 | 34.27 \pm 2.50 | 34.59 \pm 1.61 |
| Isoamyl acetate (mg/L) | nd | 4.32 \pm 2.18 | nd |
| 2-methyl butanol (mg/L) | 22.92 \pm 0.45 | 16.24 \pm 0.33 | 15.65 \pm 4.26 |
| 3-methyl butanol (mg/L) | 128.80 \pm 2.60 | 96.96 \pm 0.92 | 89.83 \pm 27.39 |
| Ethyl lactate (mg/L) | 2.79 \pm 1.98 | 2.77 \pm 1.96 | 2.49 \pm 1.76 |
| Phenethyl alcohol (mg/L) | 14.14 \pm 0.04 | 9.78 \pm 3.39 | 10.57 \pm 2.21 |
| Terpenes (mg/L) | 2.02 \pm 0.04 | 3.04 \pm 0.13 | 2.58 \pm 2.70 |

nd: non detected; JFG: juice from frozen healthy grapes (supraextraction)

The results obtained indicate that the different procedures used for juice extraction (frozen or fresh grapes, frozen or fresh juices) seem to be more relevant with regards to the final characteristics of the wine than the addition of hydrolytic enzymes. However, in the supraextraction process there were significant differences according to whether or not enzyme preparations were added and their origin, so that commercial enzyme preparations appear closely gathered (Fig. 1). Wines obtained after fermentation of juices obtained by supraextraction (FGJ), and further addition of commercial enzyme preparations (E4, E5) possess characteristics and composition very similar and totally different from the characteristics shown by wines obtained from FGJ with no enzymes added (TG) or with the addition of non-commercial enzyme preparations (E1, E2) (Fig. 1).

Table 5 shows the average data obtained after analyzing these wines resulting from supraextracted juices (FGJ) with no enzyme addition (TG) or after adding commercial (E4 and E5) or non-commercial enzymes (E1 and E2). Wine from juices (FGJ) treated with commercial enzymes (E4 and E5) had lower concentrations of acetaldehyde, ethyl-acetate and di-acetyl and higher concentrations of 2- and 3-methyl-butanol and phenethyl-alcohol than wines from juices (FGJ) with no enzymes added (TG) or treated with *Trichoderma* enzyme preparations (E1 and E2); on the other hand, wines from juices (FGJ) treated with *Trichoderma* enzyme preparations (E1 and E2) possessed higher levels of malic acid, acetaldehyde, ethyl-acetate and isoamyl-acetate, this latter compound being detectable only in this case. The remaining parameters that were measured (Table 5) showed similar values in wines from juices (FGJ) with no enzymes added or treated with any enzyme preparation, commercial or no, what indicates that their concentration does not depend on enzymatic treatments. According to Revilla et al. (Revilla, Pérez-Magariño and Gonzalez-Sanjosé, 1997), juices treated with pectolytic enzymes have higher concentrations of methanol. However, this is not the case in the wines analyzed in this study. A possible reason accounting for this result is that the methylation percentage of the grape's pectin is very low, so that polygalacturonases but no methyl esterases are responsible for the decrease in the juice viscosity (Harman and Kubicek, 1998) with almost no formation of methanol. However, both juices with or without enzymes

added had a similar methanol content, whereas the characteristics of the juices or the procedures of extraction do establish significant differences in methanol contents and the concentration of many other components (Table 5).

According to the enzyme preparations used in this study, both commercial (E4 and E5) and obtained from *Trichoderma* strains (E1 and E2) had cellulolytic, glucanolytic and/or pectolytic activities (E1, E2, E4 and E5) (Table 1). Also, it was expected aromatic compounds in general and terpenes in particular would increase considerably in wines from juices treated with these enzyme preparations, as compared to those from juices with no enzymes added (TG). Precisely, the commercial enzymatic preparation E5 is recommended after fermentation in order to increase the level of glycosilated aromatic compounds.

The differences in the wines terpene content were not significant. These results can indicate that, during fermentation, terpenic compounds are abundantly liberated, being probably steadily maintained in the wine in a soluble form. If this terpene liberation takes place too early, prior to fermentation, there seems to occur a loss of these terpenes which are probably removed by CO₂ emission or converted into cyclic compounds by biotransformation reactions (King and Dickinson, 2000). Supporting this suggestion, it has been reported that, due to biotransformation reactions during fermentation, free terpenoids are not direct products of the corresponding bound terpenoids (King and Dickinson, 2000, Pretorius, 2000).

Effects of addition of fungal hydrolytic enzyme preparations on the organoleptic characteristics of the wines: Tests were carried out by five professionals to determine the organoleptic properties of wines from juices treated or not with the different enzyme preparations, mostly colour, intensity of aroma and characteristics of aroma such as fruity, floral and herbaceous. Results indicated that there were no significant differences or peculiarities among the different wines with regards to either these sensorial features.

As indicated above, terpenoids are compounds with strong sensory qualities, and important indicators of varietal differences in grapes. The *Muscat* variety in particular has a high level of linalool which is thought to be responsible for the grape-like aroma of wines produced from this grape (King and Dickinson, 2000). On the contrary, young wines obtained from the *Palomino fino* grape do not possess fruity flavour. For either reason, biotransformation or lack of abundant precursors in this variety and the addition of fungal enzymes does not seem to dramatically increase terpene content and fruity aroma of wine.

CONCLUSIONS

The role that enzymatic preparations play on juice decantation depends on the sanitary stage of grape and the procedure applied to extract each juice. However, commercial enzyme preparations showed the greatest effect.

Even though the addition of the enzyme preparations considerably reduces the turbidity (< 100 NTU), the decantation process is favoured. Therefore, the soluble nutrients are present in concentrations to allow optimal fermentation kinetics.

The characteristics of the final wine depend of the different process used for juice extraction (frozen or fresh grape, frozen or fresh juice), but independently of the hydrolytic enzymes. The supraextraction process lead to a increase in acidity and to a higher concentrations of Na^+ , K^+ , methanol, n-propanol and iso-butanol. The concentrations of these components are related to the compounds extracted from skin grape when damage skin tissues are produced.

According to the sensorial analysis there were no significant differences among the wine with no enzyme addition and treated with enzyme extracts, therefore the addition of fungal enzymes does not increase terpene content and the fruity aroma of wine.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Salvador Vallés for providing us with data on commercial enzyme preparations.

This work was supported by CICYT project FD97-0820, INIA project VINO1-046, Junta de Andalucía PAI CVI-107.

LITERATURE CITED

Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E. and Llobell, A. (2001). An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5833-5839.

Dawson, C., Belloch, C., García-López, M. D. and Uruburu, F. (1990). Catalogue of strains, Spanish Type Culture Collection. University of Valencia, Valencia.

De la Cruz, J., Rey, M., Lora, J. M., Hidalgo-Gallego, A., Domínguez, F., Pintor-toro, J. A., Llobell, A. and Benítez, T. (1993). Carbon source control on B-glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch. Microbiol.* 159, 316-322.

Dequin, S. (2001). The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 577-588.

Dubourdieu, D., Desplanques, C., Villettaz, J. and Ribereau-Gayon, P. (1985). Investigations of an industrial B-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydr. Res.* 144, 277-287.

Dubordieu, D. and Ollivier, C. (1989). Évolutions récentes des techniques d'élaboration des vins blancs en Bordelais. *CR Act. Rech. Inst. Oenol. Bordeaux*, 98-99.

García-Maceira, F. I. (2000). Caracterización molecular de poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum*: determinación de su papel en el mecanismo de patogénesis. Ph.D. Thesis, University of Córdoba.

- González, R., Ramón, D. and Pérez-González, J.A. (1992). Cloning, sequence analysis and yeast expression of the *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 370-375.
- Harman, G. E., and Kubicek, C. P. (eds.). (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications. *Taylor and Francis*, London.
- King, A., and Dickinson, R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499-506.
- Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A. and Benítez, T. (1998). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89, 254-261.
- Martínez de la Ossa, E., Caro, I., Bonat, M., Pérez, L. and Domecq, B. (1987a). Dry extract in sherry and its evolution in the aging process. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 321-325.
- Martínez de la Ossa, E., Pérez, L. and Caro, I. (1987b). Variations of the major volatiles through aging of sherry. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 293-297.
- Martínez, P., Valcárcel, M. J., Pérez, L. and Benítez, T. (1998). Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 240-250.
- Métodos Oficiales de Análisis. (1976). Productos derivados de la uva. Ministerio de Agricultura: Madrid, Spain, pp. 56-58.
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, Ed., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L. and Stahl, U. (2002). Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res.* 2, 225-232.
- Office International de la Vigne et du Vin. (1978). Recueil des Methodes Internationales d'Analysis des Vin. O.I.V., Paris.
- Ostergaards, S., Olsson, L. and Nielsen, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 34-50.
- Pretorius, I. (2000). Tailoring wine yeasts for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puertas García, B. (1989). Estudio sobre el potencial vitícola y enológico de quince variedades blancas de vid en la zona del jerez. Ph. D. *Thesis*, University of Cádiz .

Revilla, I., Pérez-Magariño, S. and Gonzalez-Sanjosé, M. L. (1997). Mostos y vinos elaborados con enzimas pectinolíticos: contenido de metanol. Grupos de Investigación Enológica. *Actas de las Jornadas Científicas'97*, C. G. Barroso (Ed.), pp. 137-142.

Rhem, H. J. and Reed, G. (1996). *Biotechnology Vol. 9: Enzymes, Biomass, Food and Feed*. VCH, Weinheim, Germany.

Varela, F., Calderón, F., Suárez, J. A. and Garcia, J. (1997). Incidencia del desfangado sobre la composición nitrogenada y cinética fermentativa de vinos blancos. Grupos de Investigación Enológica. *Actas de las Jornadas Científicas'97*, C. G. Barroso (Ed.), pp. 403-408.

Visser, J. and Voragen, A. G. J. (eds.). (1996) *Progress in Biotechnology vol. 14: Pectins and Pectinases*. *Elsevier Science*, Amsterdam.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

La aplicación de nuevas tecnologías para la mejora aromática de los vinos de *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* frente a los métodos tradicionales de elaboración supone un aumento considerable de la calidad de los vinos. La elección, la racionalización y el éxito de estas aplicaciones están condicionadas, en gran medida, por las características y origen de la materia prima, así como por el conjunto de operaciones mecánicas aplicadas a la uva.

1) Sobre la aplicación de la técnica de maceración pelicular:

- ✓ La aplicación de la maceración pelicular produce pocos efectos sobre la composición fisicoquímica del mosto. Únicamente se constata una ligera reducción de la acidez total y un aumento del pH y de los polifenoles.
- ✓ La maceración pelicular conlleva a un aumento de los fangos así como de la turbidez de los mostos, debido a fenómenos de micronización de la materia sólida. La eficacia del desfangado estático está condicionada por el equilibrio entre este fenómeno y la actividad pectolítica presente en los mostos de cada variedad. La técnica de maceración pelicular no afecta a la cinética fermentativa, sin embargo, el rendimiento alcohólico aumenta con el tiempo de maceración. Ello puede ser debido a que en los fangos se encuentran componentes que activan y favorecen la fermentación. El IPT y la tendencia al pardeamiento alcanza un máximo a las 4 horas de tratamiento para ambas variedades. En cuanto al color, los vinos de *Palomino fino* aumentan su intensidad y la componente amarilla; sin embargo, en los vinos de *Moscatel* se produce una disminución de la intensidad y una pérdida del color verde.

- ✓ La maceración pelicular produce un aumento significativo de los ésteres con carácter afrutado (principalmente octanoato de etilo) para ambas variedades. Sin embargo, el contenido en los compuestos con carácter herbáceo, representados por el 1-hexanol, el trans-2-hexen-1-ol y el cis-3-hexen-1-ol no se modifican durante la maceración, incluso disminuyen ligeramente. En el caso de los vinos de *Moscatel*, el tiempo de maceración conduce a un aumento del carácter floral debido a la extracción de compuestos terpénicos y derivados. En el análisis de componentes principales se extraen dos factores relacionados con la calidad aromática de los vinos. La combinación de ambos factores se elige como criterio de calidad aromática estableciéndose un tiempo óptimo de maceración de entre 8 y 12 horas para ambas variedades.

- ✓ Los resultados de la cata muestran preferencia sobre los vinos de *Palomino* macerados durante 8 y 12 horas. En el caso de los vinos de *Moscatel*, no se producen diferencias significativas de valoración con los tiempos de maceración.

2) Sobre la aplicación de la técnica de supraextracción:

- ✓ La técnica de supraextracción conduce a una destrucción del tejido celular con mayor incidencia en la cara interna del hollejo a nivel microscópico. Esta técnica produce de forma generalizada para ambas variedades una disminución del rendimiento de extracción del mosto y aumento de la densidad por pérdida de agua, una disminución de la acidez y aumento del pH y, asimismo, una disminución del IPT.

- ✓ La supraextracción conlleva a un aumento de la turbidez de los mostos que no afecta a la eficacia del desfangado. Incluso favorece la compactación de los fangos en los mostos de *Moscatel*.
- ✓ Las partículas producidas por la supraextracción, responsables de la turbidez, tienen una incidencia positiva sobre la velocidad de fermentación, favoreciendo el desarrollo de las levaduras. Como consecuencia de ello, esta técnica incrementa el rendimiento alcohólico y disminuye la acidez volátil. De forma generalizada, los vinos producidos tienen un menor IPT y una menor tendencia al pardeamiento.
- ✓ Desde el punto de vista aromático la supraextracción conduce a un aumento muy significativo de los ésteres y terpenos responsables del carácter afrutado y floral de los vinos de ambas variedades. Asimismo, se produce una disminución de los compuestos con carácter herbáceo (1-hexanol), láctico (ácido octanoico) y de oxidación (ácido decanoico).
- ✓ La cata comparativa demuestra que la supraextracción conduce a vinos con mayor y mejor calidad e intensidad aromática en los vinos de *Palomino*. Sin embargo, los vinos de *Moscatel* obtenidos con esta técnica no presentaron diferencias significativas con el testigo, calificándose sensorialmente de forma general con mayor intensidad aromática, pero de calidad inferior.

3) Sobre el empleo de cepas de levaduras comerciales:

- ✓ Las cepas de levadura estudiadas presentaron un buen desarrollo durante la fermentación en los mostos de ambas variedades dando lugar a vinos con características fisicoquímicas similares, entre las cuales destacó el alto rendimiento alcohólico obtenido en todos los casos.
- ✓ La variedad de uva empleada en la vinificación tiene mayor influencia sobre el contenido en alcoholes superiores que las cepas empleadas. La relación entre alcoholes isoamílicos para los vinos de *Palomino fino* es de 1/3, mientras que la de los vinos de *Moscatel* es de 1/5 con todas las cepas empleadas.
- ✓ La cepa PC presentó el menor contenido en compuestos volátiles y, por tanto, la menor contribución de las distintas series al perfil aromático de los vinos. En dichos vinos destacó, sin embargo, la aportación del acetaldehído, compuesto de gran importancia en los vinos sometidos a crianza biológica. Los vinos elaborados con la cepa PC se evaluaron como vinos “ajerezados” incluso cuando la variedad de uva empleada fue la *Moscatel*.
- ✓ Desde el punto de vista sensorial, en general, los vinos elaborados con la cepa FERMIVIN presentaron aromas con mayor aportación del afrutado (manzana, piña y pera) independientemente de la variedad de uva empleada, sin embargo, la variedad influye notablemente en la contribución de los aromas florales, producidos principalmente por los compuestos terpénicos.
- ✓ Para obtener vinos aromáticos a partir de mostos de variedades neutras o poco aromáticas, es más adecuado el empleo de cepas de levadura comerciales productoras de aromas como la CK o la FERMIVIN. Sin embargo, si la

variedad es muy aromática, como el caso de la *Moscatel*, las cepas que conducen a mejores resultados desde el punto de vista de mayor concentración de aromas son las cepas como la ENSIS, que respetan la tipicidad varietal.

4) Sobre la aplicación de enzimas comerciales tras la fermentación:

- ✓ El empleo de los extractos enzimáticos NOVOFERM 12G y AR2000 no influye significativamente en los parámetros analíticos de los vinos de ambas variedades. Los parámetros CIELAB si están influenciados por el uso de extractos enzimáticos, dependiendo de la variedad y el extracto empleado.
- ✓ Los tratamientos enzimáticos estudiados afectan considerablemente al contenido en aromas de los vinos tratados de ambas variedades, pues poseen actividades hidrolasas que disminuyen considerablemente el nivel de ésteres (acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo) y su contribución al aroma. Asimismo, poseen algún tipo de actividad esterasa dada la importante formación de succinato de etilo.
- ✓ En cuanto al contenido en terpenos y su contribución al aroma, los tratamientos enzimáticos empleados producen un aumento del contenido en terpenos dependiendo de la variedad y de la cepa de levadura empleada en la fermentación, que determina el contenido en precursores aromáticos del vino.
- ✓ La actividad β -glucosidasa de los extractos empleados no parece ser suficiente ni encontrarse lo suficientemente pura como para mejorar el valor de aroma de los vinos. Para optimizar el empleo de extractos enzimáticos es necesario un mayor conocimiento de las actividades principales y residuales de los mismos así como de las unidades de dicha actividad por gramo de extracto.

5) Sobre el estudio comparativo entre las técnicas empleadas:

- ✓ El análisis de componentes principales (PCA) de los valores de aroma de los vinos resulta un método eficaz para diferenciar las distintas técnicas empleadas. En dicho análisis se extraen dos factores que engloban a las variables que presentan mayor contribución al aroma de los vinos para cada variedad y relacionados con la calidad aromática de los vinos.
- ✓ La representación de F1 vs F2 agrupa a los diferentes vinos según la técnica aplicada en su elaboración. Para ambas variedades se distinguen tres grupos claramente diferenciados que constatan la importancia de la técnica empleada sobre la calidad aromática de los vinos: cepas-enzimas, maceración pelicular y supraextracción. Estos últimos presentaron la mayor intensidad y calidad de aroma dada la mayor contribución de los aromas floral y afrutado al perfil de los mismos.
- ✓ El F1 establece diferencias entre las técnicas prefermentativas y las técnicas basadas en el empleo de cepas de levaduras, con más o menos capacidad de liberar aromas, y con el uso o no de extractos enzimáticos comerciales tras la fermentación.
- ✓ Las operaciones mecánicas realizadas desde la recepción de la uva hasta la extracción del mosto influyen de manera importante en las características aromáticas de los vinos. Se constata que el proceso de prensado influye sensiblemente en la calidad de los vinos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aerny, J.** Composés azotés des moûts et des vins. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic., 28 :161-165, 1997.
2. **Aldave, L.** Effects de la macération pelliculaire sur cépages *Vermentino* et *Semillon*. Rev. Fr. D'Oenol. 135, 9, 1992a.
3. **Aldave de las Heras, L; Le Fur, Y; Feuillat, M.** Skin contact maceration effects on wines made from the grape cv *Vermentino* and *Semillon*. Sci. des Alim. 12(3):483-492, 1992b.
4. **Aleixandre, JL.** Control de la temperatura en el proceso de vinificación en blanco. Vitivinicultura 2:35-44, 1991.
5. **Aleixandre, JL; García, MJ.** Influencia del prensado en la calidad del vino. Viticultura y Enología Profesional, 24:31-37, 1993.
6. **Almela, L; Javaloy, S; Fernández-López, JA; López-Roca, JM.** Varietal classification of young red wines in terms of chemical and colour parameters. J. Sci. Food Agric., 70, 173-180, 1996.
7. **Amati, A; Pallota, U; Potentini, G; Zironi, R.** La maceración en frío para la mejora de los vinos blancos. Vitivinicultura, 1: 46-52, 1992.
8. **Amerine, MA; Roessler, EB.** Wines. Their sensory evaluation. Ed. Freeman. New York, 1983.
9. **Antonelli, A; Castellari, L; Zambonelli, C; Carnacini, A.** Yeast influence on volatile composition of wines. J. Agric. Food Chem., 47:1139-1144, 1999.
10. **Aryan, AR; Wilson, B; Strauss, CR; Williams, PJ.** The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their β -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. Am. J. Enol. Vitic. 38(3):182-188, 1987.
11. **Asselin, C y Delteil, D.** Vinificaciones: principales operaciones unitarias. En Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 418-442, 2000.

BIBLIOGRAFÍA

12. **Balcones, E; Calvo, MM.** Principales levaduras de interés enológico. Aliment. Equipos y Tecnol., 83-87, 1996.
13. **Barre, P; Blondin, B; Dequin, S; Feuillat, M; Sablayrolles, JM; Salmon, JM.** La levadura de fermentación alcohólica. En Flanzy, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 245-273, 2000.
14. **Baumes, R.; Bayonove, CL, Barillère, IM; Escudier, JL; Cordonnier, R.** La macération pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la composante volatile des mouts. Conn Vigne Vin, 22:209-223, 1988.
15. **Baumes, R.; Bayonove, CL, Barillère, IM; Escudier, JL; Samson, A; Cordonnier, R.** La macération pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la composante volatile des vins. Vitis, 28:31, 1989a.
16. **Baumes, R; Bayonove, C; Cordonnier, R; Torres, P; Seguin, A.** Incidence de la macération pelliculaire sur la composante aromatique des VDN de *Muscat*. Rev. Fr. Oenol, 115:6, 1989b.
17. **Bayonove, C; Gunata, Z; Cordonnier, R.** Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arôme du jus de Muscat avant fermentation: la production de terpénols. Bull OIV, 57: 643-644, 740-758, 1984.
18. **Bayonove; C; Cabaroglu, T; Dufour, C; Razungles, A; Sapis, IC; Baumes, R; Gunata, Z.** Influence du collage sur le potentiel aromatique variétal du vin. CR 21e Congrès mondial de la Vigne et du Vin, OEnologie, OIV, 150-161, 1995.
19. **Bayonove, C; Baumes, R; Crouzet, J; Günata, Z.** Aromas. En Flanzy, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 137-168, 2000.
20. **Belitz, HD; Grosch, W.** Química de los alimentos. 1ª edición. Editorial Acribia, SA, Zaragoza, 1988.
21. **Bena-Txourou, I; Lanaridis, P; Metafa, M** Influence of cluster thinning on the amino acids concentration of musts and wines of the variety *Vilana*. Effect on wine volatile compounds. J. Int. Sci.Vigne Vin, 33(3) : 111-117, 1999.
- 22.

23. **Bertrand, A.** Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. Tesis Doctoral. Université de Bordeaux II, 1975.
24. **Bertrand, A.** Influence de la nature des levures et des conditions de leur développement sur la production des arômes et les conditions de leur stabilité. En Ribéreau-Gayón, P; Sudraud, P. Actualités oenologiques et viticoles, Dunod, Paris, 266-273, 1981.
25. **Bertrand, A; Arathona-Serrano, J; Ollivier, C.** Incidence du débouillage et rôle des lipides sur la formation par les levures des produits secondaires lors de la vivification en blanc. CR Act. Rech. Inst. Oenol. Bordeaux 1984-1986:69-71, 1987.
26. **Bertrand, A; De Revel, G.** Utilisation d'une nouvelle technologie en vinification pour l'amélioration de l'arôme du vin. Revue des OEnologues, 80 :19-22, 1998.
27. **Bertrand, A; De Revel, G; Pripis-Nicolau, L.** Evaluation sensorielle des conséquences de la fermentation malolactique pour le vin blanc en barriques. Bull. OIV, 73(831-32) :313-321, 2000.
28. **Bisson, J; Daulny, B; Bertrand, A.** Influence de la température de fermentation sur la composition d'un vin blanc sec. Conn. Vigne Vin, 14:195-202, 1980.
29. **Bitteur, S; Günata, Y; Brillouet, J; Bayonove, C; Cordonnier, R.** GC and HPLC of grape monoterpenyl glycosides. J. Sci. Food Agric., 47:341-352, 1989.
30. **Cabaroglu, T; Cubas, A; Baumes, R; Bayonove, C; Lepoutre, JP; Günata, Z.** Aroma composition of a white wine of *Vitis vinifera* L. cv. *Emir* as affected by skin contact. J. Food Sci. 62(4):680-683, 1997.
31. **Cabaroglu, T; Selli, S; Canbas, A; Lepoutre, JP; Günata, Z.** Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. Enzyme Microb. Technol., 33: 581-587, 2003.
32. **Cabrera, MJ; Moreno, J; Ortega, JM y Medina, M.** Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from *Pedro Ximenez* grapes in various degrees of ripeness. Am. J. Enol. Vitic. 39:283-287, 1988.
33. **Cacho, JF.** El aroma del vino y sus precursores. Salón Internacional del Vino de las regiones Pirenaicas. Barbastro (Huesca), 1994.

BIBLIOGRAFÍA

34. **Cacho, JF.** El vino, su composición y nuestros sentidos. Discurso de ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Química y Naturales de Zaragoza, 2003.
35. **Caillet, MM.** Stabilisation et clarification des vins par le collage. Rev. OEnologues, 74:15-18, 1994.
36. Campo, E; Ferreira, V; Escudero, A; Marqués, J.C.; Cacho, J. Quantitative gas chromatography-olfatometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. Anal. Chem. Acta, 563:180-187, 2006.
37. **Castellucci, F.** Resolución OENO 1/2006. OIV. Julio 2006.
38. **Castrejón, F.** Mejora de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizables en la elaboración de vinos de Jerez. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 2000.
39. **Castro, L; Pinilla, MJ; Pérez-Coello, MS; Cabezudo, MD.** Tratamiento de vinos varietales con enzimas glucosidásicos. VI Jornadas Científicas 2001, GIE, Libro resúmenes *Tecnología enológica y viticultura*, pp. 87, Valencia, 2001.
40. **Castro, L; Pérez-Coello, MS y Cabezudo, MD.** Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from *Chardonnay*, *Muscat*, *Airén*, and *Macabeo* grapes. Anal. Chim. Acta, 458(1): 39-44, 2002.
41. **Castro-Vázquez, L ; Díaz-Maroto, MC ; Pérez-Coello, MS.** Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. Food Chem., 103:601-606, 2007.
42. **Chatonet, P; Boidron, JN; Pons, M.** Élevage des vins rouges en fût de chene: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. Sci. Aliments, 10:565-587, 1990.
43. **Chauvét, S; Sudraud, P and Jouan, J.** La cryoextraction sélective des moûts. Premières observations, perspectives. Bull l'OIV. 667-668:27-29, 1986.
44. **Chauvét, S; Sudraud, P; Jouan, J.** Nouveau procédé d'extraction des moûts. Brevet kreyer. Rev. OEnol. 46:7-11, 1987.
45. **Chauvet, S; Sudraud, P.** Selective cryoextraction (cold pressing). Revue di Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques, 65 : 31-33, 1992.

46. **Cheynier, V; Rigaud, J; Souquet, JM; Brarillère, JM; Moutounet, M.** Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of *Grenache* and *Chardonnay* wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40(1):36-42, 1989.
47. **Cheynier, V; Moutounet, M.** Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 40(11):2038-2044, 1992.
48. **Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Unidad de Prospectiva.** Diagnóstico del Sector Vitivinícola y de las bodegas en el Marco de Jerez, Julio 2002.
49. **Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen Jerez-Xérèz-Sherry, Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda.** Memoria de actividades, Jerez de la Frontera (Cádiz), 1990-2005
50. **Cordonnier, R ; Bayonove, C ; Baumes, SR.** Donnes recentes sur les precursseurs d'arôme du raisin. Perspectives de leur exploitation en vinification. *Rev. Fr. Oenol.*, 102:29-41, 1986.
51. **Coutinho, P ; Rocha, S ; Coimbra, MA.** Efeito do tratamento com enzimas libertadoras de aroma na qualidade dos vinhos brancos da regio Demarcada da Bairrada: Maria Gomex e Bical, 6º Encontro de Química de Alimentos, *Novas Perspectivas Sobre Conservação, Processamento e Qualidade De Alimentos*, Lisboa (Portugal), 1:127-130, 2003.
52. **Crouzet, J; Flanzy, C; Martín, JC; Sapis, JC.** Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins. *Rev. Fr. Oenol.*, Lattes, France, 279-287, 1984.
53. **Crouzet, J.** Les enzymes de l'arôme des vins. *Rev. Fr. Oenologie*, 102 :42-49, 1986.
54. **Crouzet, J; Flanzy, C; Günata, Z; Pellerin, P; Sapis, JC.** Las enzimas en enología. En Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 245-273, 2000.
55. **Darias, JJ; Rodríguez, O; Díaz, E; Lamuela-Raventós, RM.** Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chem.*71:483-487, 2000.
56. **Darias-Martín, J; Díaz-González, D; Díaz-Romero, C.** Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *J. Food Eng.* 63:335-340, 2004.

57. **Davis, CR; Wibowo, D; Eschenbruch, R; Lee, TH; Fleet, GM.** Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36 :290-300, 1985
58. **De Revel, G; Martin, N; Pripis-Nicolau, L; Lonvaud-Funel, A; Bertrand, A.** Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 47 :4003-4008, 1999.
59. **Defranoux, C; Gineys, D; Joseph, P.** Le potentiel aromatique du *Chardonnay*. Essai d'utilisation des techniques de cryoextraction et de supraextraction (procédé dreyer). *Rev. Oenol.* Pp 27-29, 1988.
60. **Delcroix, A; Günata, Z; Sapis, JC; Salmon, JM; Bayonove, C.** Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45:291-296, 1994.
61. **Delfini, C; Cocito, C; Bonino, M; Schellino, R; Gaia, P; Baiocchi, C.** Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas. *J. Agri. Food Chem.*, 49: 5397-5408, 2001.
62. **Delteil, D; Feuillat, M; Guilloux-Benatier, M; Sapis, JC.** Los vinos blancos secos. En Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 443-453, 2000.
63. **Dimitriadis, E y Williams.** Development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavourants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 35(23): 66-71, 1984.
64. **Di Stefano, R.** Terpene compounds of white *Muscat* from Piemonte. *Vini Ital.* 23:29-43, 1981.
65. **Di Stefano, R; Corino, L.** Caratteristiche chimiche ed aromatiche di vini secchi prodotti con Moscato bianco e giallo di Chambave e con Moscato bianco di canelli. *Riv. Vitic. Enol.*, 1:1-11, 1986.
66. **Di Stefano, R.** Proposition d'une méthode de préparation de l'échantillon pour la détermination des terpènes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bull. OIV*, 721-722:219-223, 1991

67. **Doco, T; Brillouet, JM; Moutounet, M.** Evolution of grape (*Carignan noir* cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47:108-110, 1996.
68. **Dubois, P.** Les arômes dens vins et leurs défauts. *Rev. Fr. OEnol*, 145:27-40, 1994.
69. **Dubourdieu, D; Olliver, C; Boidron, JN.** Incidence des operations prefermentaires sur la composition chimique et les qualités organolpetiques des vins blancs secs. *Conn. vigne*, 20 (1): 53.76, 1986.
70. **Dubourdieu, D; Olliver, C.** Évolutions récentes des techniques d'élaboration des vins blancs en Bordelais. *CR Act Rech Inst OEnol Bordeaux* 1986-1988, 98-99, 1989.
71. **Dugelay, I.** L'arôme du raisin: étude des précurseurs hétérosidiques et des activités enzymatiques exogenes impliquées dans leur hydrolise; applications technologiques. Thèse école nationale supérieure agronomique de Montpellier. 1993.
72. **Escudero, A; Hernández-Orte, P; Cacho, J.; Ferreira, V.** Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *J. Agric. Food Chem.*, 48(9):4268-4272, 2000.
73. **Escudier, JL; Moutounet, M; Batlle, JL; Brugirard, A; Dubernet, M; Saint-Pierre, B; Vernhet, A.** Clarificación, estabilización de los vinos. En Flanzky, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 558-607, 2000.
74. **Estévez, P; Gil, ML; Falqué, E.** Effects of seven yeast strains on the volatile composition of *Palomino* wines. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 39:61-69, 2004.
75. **Falqué, E. y Fernández, E.** Effects of different skin contact times on *Treixadura* wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47(3):309-312, 1996.
76. **Falqué, E; Fernández, E; Dubourdieu, D.** Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta*, 54:271-281, 2001.
77. **Fauvet, J; Guittard, A.** La vinificación en rosado. En Flanzky, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 454-461, 2000.

78. **Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB).** Memoria, 2001.
79. **Federación Española del vino.** Memoria 2005. Asamblea General, 8 de Marzo de 2006.
80. **Fernández-González, M; Di Stefano, R; Briones, A.** Hydrolysis and transformation of terpene glucosides from *Muscat* must by different yeast species. *Food Microbiol.*, 20: 35-41, 2003.
81. **Fernández-González, M; Di Stefano, R.** Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lebensm-Wiss u Technol.*, 37:467-473, 2004.
82. **Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V; Peña, C.; Escudero, A.; Cacho, J.** Effects of maceration time and pectolytic enzymes added during maceration on the phenolic composition of must. *Food Sci. Technol. Int.*, 5 (4): 319-325, 1999.
83. **Ferreira, V.** Nuevas aportaciones a la química analítica del aroma del vino. Ph D. thesis. Zaragoza University, 1992.
84. **Ferreira, B; Hory, C; Bard, MH; Taisant, C; Olsson, A; Le Fur, Y.** Effects of skin contact and settling on the level of the C18:2, C18:3 fatty acids and C6 compounds in Burgundy *Chardonnay* musts and wines. *Food Qual. Prefer.*, 6(1): 35-41, 1995.
85. **Ferreira, V; Fernández, P; Cacho, JF.** A study of factors affecting wine volatile composition and its application in discriminant analysis. *Lebensm-Wiss U Technol.*, 29:251-259, 1996.
86. **Ferreira, V; López, R; Cacho, J.** Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 80:1659-1667, 2000.
87. **Ferreira, V.** Los aromas del vino. Curso Temas actuales de interés enológico. Universitat Rovira I Virgili, Zaragoza, 2001.
88. **Ferreira, V.; Ortín, N; Escudero, A; López, R; Cacho, J.** Chemical characterization of the aroma of Grenache Rosé wines : aroma extract dilution analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.*, 50 :4048-4054, 2002.

89. **Feuillat, M.** La clarification des moûts en vinification en blanc ou débourbage. Rev. Fr. OEnol, 153:69-74, 1995.
90. **Fleet, GH.** Yeast interactions and wine flavour. Int. J. Food Microbiol., 86: 11-22, 2003.
91. **Fonseca, f; Teixeira de Moraes Plizeli, ML; Terenzi, HF; Atílio, J.** β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. FEMS Microbiol. Lett., 240:137-143, 2004.
92. **Francis, IL; Sefton, MA; Williams, PJ.** A study by sensory descriptive analysis of the effects of oak origin, seasoning and heating on the aromas of oak model wine extracts. Am. J. Enol. Vitic., 43:23-30, 1992a.
93. **Francis, IL; Sefton, MA; Williams, PJ.** Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from *Semillon*, *Chardonnay* and *Sauvignon blanc* grape juices. J. Sc. Food Agric. 59:511-520, 1992b.
94. **Frankel, EN; Waterhouse, A; Teissedre, PL.** Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. J. Agric. Food Chem., 43:890-894, 1995.
95. **Gallifuoco, A; Alfani, E; Cantarella, M; Spagna, G; Pifferi, PG.** Immobilized β -glucosidase for the winemaking industry: Study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. Process Biochem., 35: 179-185, 1999.
96. **Ganga, A; Pinaga, F; Querol, A; Valles, S; Ramon, D.** Cell-wall degrading enzymes in the release of grape aroma precursors. Food Sci. Tech. Int, 7(1): 83-87, 2001.
97. **García de Luján, A; Puertas García, B; Lara Benítez, M.** Variedades de vid de Andalucía. Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias. Junta de Andalucía, 1990.
98. **García, J.** Técnicas analíticas para vinos. Ediciones GAB, 1990.
99. **García-Romero, E.; Pérez-Coello, M.; Cabezudo, M. D.; Sanchez-Muñoz, G.; Martín-Alvarez, P. J.** *Fruity flavor increase of Spanish Airén white wines made by brief fermentation skin contact.* Food Sci. Tech. Int., 5 (2): 149-157, 1999.

100. **Gerland, C.** Defectos aromáticos de los vinos en relación con la calidad de las uvas.
<http://www.verema.com/opinamos/articulos/articulo.asp?articulo=286>.
101. **Genovés, S; Gil, JV; Vallés, S; Casas, JA; Manzanares, P.** Assesment of the aromatic potential of *Palomino fino* grape must using glicosidasas. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56(2):188-191, 2005.
102. **Gil, M; Cabellos, JM; Arroyo, T; Prodanow, M.** Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Anal. Chim. Acta*, 563:145-153, 2006.
103. **Gómez, J; Palacios, V; Szekely, P; Veas, R; Pérez, L.** Comparation of electrodialysis and cold treatment on an industrial scale for tartrate stabilization of sherry wine. *J. Food Eng.*, 58(4):373-378, 2003.
104. **Gómez-Míguez, MJ; González-Miret, ML; Hernanz, D; Fernández, MA; Vicario, IM; Heredia, FJ.** Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *J. Food Eng.*, 78:238-245, 2006.
105. **Gómez-Míguez, MJ; Gómez-Míguez, M; Vicario, IM; Heredia, FJ.** Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *J. Food Eng.*, 79:758-764, 2007.
106. **Gómez-Plaza, E; Gil-Muñoz, R; Carreño-Espín, J; Fernández-López, JA; Martínez-Cutillas, A.** Investigation on the aroma of wines from seven clones of *Monastrell* grapes. *Eur. Food Res. Tech.*, 209:257-260, 1999.
107. **González, R; Ramón, D; Pérez-González, JA.** Cloning, sequence analysis and yeast expression of the *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 370-375, 1992.
108. **Gorinstein, S; Goldblum, A; Kitov, S; Deutsch, J; Loinger, C; Cohem, S; Tabakman, H; Stiller, A; Zyberman, A.** The relation between metals, polyphenols, nitrogenous substances and treatments of red and white wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 35:9-15, 1984.

109. **Gracia, JP.** Volatile acidity and cessation of fermentation. A study of causative factors and possible solutions. PhD thesis. School of Science, University of Saragossa, Spain, 1996.
110. **Granchi, L; Ganucci, D; Messini, A; Vincenzini, M.** Oenological properties of *Hanseniospora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. FEMS Yeast Res., 2:403-407, 2002.
111. **Grossman, M; Rapp, A; Rieth, W.** Enzymatische freisetzung gebundener aromastoffe in wein. Dtsch Lebensm Rdsch., 83:7-12, 1987.
112. **Guillou, C; Aleixandre, JL; García, MJ; Lizama, V.** Clarification influence upon sensorial and analytical characteristics of Muscat dry wine. J. Int. Sci. Vigne Vin. 32:111-119, 1998.
113. **Guitart, A.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J.** Effects of maceration on the amino acid content of *Chardonnay* musts and wines. Vitis, 36 (1): 43-47, 1997.
114. **Günata, YZ; Bayonove, CL; Baumes, RL; Codornier, RE.** The aroma of grapes: Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. J. Chromatogr. 331(1):83-90, 1985.
115. **Günata, YZ; Bayonove, CL; Baumes, RL; Codornier, RE.** Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing: Preliminary results. Am. J. Enol. Vitic., 37(2):112-114, 1986.
116. **Günata, YZ; Bitteur, S; Baumes, R; Brillouet, IM; Bayonove, C; Codornier, R.** Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grapes. Carbohydr. Res. 184:139-149, 1988.
117. **Günata, Z; Dugelay, I; Sapis, IC; Baumes, R; Bayonove, C.** Action des glycosidases exogenes au cours de la vinification: liberation de l'arôme a partir de précurseurs glycosidiques. Conn. Vigne Vin, 24:133-144, 1990.
118. **Günata, Z; Vallier, MJ; Baumes, R; Bayonove, C.** Production d'une β -glucosidase d'origine fongique peu sensible a l'inhibition par le glucose. Brevet français Inra, n° 9S08185, 1995.

119. **Guth, H.** Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (8):3027 -3032, 1997.
120. **Gutiérrez, AR; Santamaria, MP; López, T; Comi, A.** La maceración de la uva. Efectos sobre el contenido en compuestos terpénicos del mosto y sobre la elaboración de vinos blancos. *Vitivinicultura*, 9:48-51, 1990.
121. **Han, R; Li, H; Zhang, J; Xiao, H; Shi, J.** Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast. *J. Haz. Mat.*, B137: 1569-1576, 2006.
122. **Hardie, W; O'Brien, T.** Considerations of the biological significance of some volatile constituents of grape (*Vitis spp*). *Aust. J. Bot.*, 36:107-117, 1988.
123. **Harman, GE; Kubicek, CP.** *Trichoderma* and *Gliocladium*, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, Vol. 2. Taylor & Francis, London, pp 393, 1998.
124. **Heredía, FJ; Troncoso, AM; Guzmán-Chozas, M.** Multivariate characterization of aging status in red wines based on chromatic parameters. *Food Chem.*, 60, 103-108, 1997.
125. **Hernández, L.F.; Espinosa, J.C.; Fernández-González, M.; Briones, A.** β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.*, 80:171-176, 2002.
126. **Hernández-Orte, P.; Guitart, A.; Ferreira, V.; Gracia, J.; Cacho, J.** Effect of maceration time and the addition of enzymes on the amino acid composition of musts and wines and its influence on wine aroma. *Food Sci. Technol. Int.*, 4(6): 407-418, 1998.
127. **Hernández-Orte, P.; Ibarz, MJ.; Cacho, J; Ferreira, V.** Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.*, 89: 163-174, 2005.
128. **Hidalgo, J.** Tratado de Enología (Tomos 1 y 2). Ed. Mundi-prensa , Madrid, 2003.
129. **Hidalgo, J.** La calidad del vino desde el viñedo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 2006.

-
130. **Hovart, RJ; Chapman, GW; Robertson, JA; Meredith, FI; Scorza, R; Callahan, AM; Morgens, P.** Comparison of the volatile compounds from several commercial peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38:234-237, 1990.
131. **Joseph, P.** The aromatic potential of *Chardonnay*. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques*, 65 : 42-46, 1992.
132. **King, A; Dickinson, JR.** Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 16(6):499-506, 2000.
133. **Kirchman, PA; Botta, G.** Copper supplementation increases yeast life span under conditions requiring respiratory metabolism. *Mech. Ageing Dev.*, 128:187-195, 2007.
134. **Klingshirn L; Liu, JR; Gallander, JF.** Higher alcohol formation in wines as related to particle size profile of juice insoluble solids. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:207-209, 1987.
135. **Kristl, J; Veber, M; Slekovec, M.** The contents of Cu, Mn, Zn, Cd, Cr and Pb at different stages of the winemaking process. *Acta Chim. Slov.*, 50 :123-136, 2003.
136. **Le Fur, Y.** Typicité et macération pelliculaire. Application au cépage Chardonnay en Bourgogne. *Revue des Oenologues*, 1989.
137. **Le Fur, Y.** Typicité et macération pelliculaire. Application au cépage *Chardonnay* en Bourgogne. *Rev. Ienol. Technol. Vitiv.* 24, 1990a.
138. **Le Fur, Y; Ferrari, G.** *Premiers resultats d'essais de macération pelliculaire sur cépage Chardonnay en Bourgogne.* *Rev. Des Enol.* 55:41-44, 1990b.
139. **Ledoux, V; Dubordieu, D.** Stabilisation proteique des vins blancs. *Rev. Oenol.*, 73S:41-42, 1994.
140. **Lilly, M; Lambrechts, MG; Pretorius, IS.** Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environm. Microbiol.*, 66(2):744-753, 2000.
141. **Liu, JR; Gallander, JF; Wilker, KR.** Effect of juice clarification on the composition and quality of eastern US table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:147-150, 1987.
-

142. **Llauradó, J; Rozès, N; Bobet, R; Mas, A; Constantí, M.** Low temperature alcohol fermentations in high sugar concentration grape musts. *J. Food Sci.*, 67(1):268-273, 2002.
143. **López-Tamanes, E; Carro-Marino, N; Gunata, YZ; Sapis, C; Baumes, R; Bayonove, C.** Potential aroma in several varieties of spanish grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 45(5): 1729-1735, 1997.
144. **Lubbers, S; Charpentier, C; Feuillat, M.** Etude de la rétention de composés d'arôme par les bentonites en moût, vin et milieux modèles. *Vitis*, 35:59-62, 1996.
145. **Macheix, JJ; Sapis, JC; Fleuriet, A.** Phenolic compounds and polyphenoloxidases in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 30:441-486, 1991.
146. **Mafra, I; Lanza, B; Marsilio, V; Campestre, C; De Angelis, M; Coimbra, MA.** Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiol. Plant.*, 111:439-447, 2001.
147. **Majdak, A; Herjavec, S; Orlic, S; Redzepovic, S; Mirosevic, N.** Comparison of wine aroma compounds produced by *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 40(2):103-109, 2002.
148. **Mallet, CP** (ed). *Tecnología de los alimentos congelados*. AMV Ediciones, Madrid, 1994.
149. **Manzanares, P; Orejas, M; Gil, JV; de Graaff, L; Visser, J; Ramón, D.** Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding and α -L-rhamnosidase of enological interest. *Appl. Environ Microbiol.*, 69(12):7558-7562, 2003.
150. **Marais, J.** Terpenes in the aroma of grapes and wines: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 42:49-60, 1983.
151. **Marais, J.** Effect of grape temperature, oxidation and skin contact on *Sauvignon blanc* juice and wine composition. *S. Afr. J. for Enol. Vitic.*, 19(1):10-16, 1998.

152. **Martínez, P.** Evolución y caracterización de las poblaciones de levaduras responsables de la crianza biológica de los vinos de Jerez. Tesis Doctoral. Departamento de Genética. Universidad de Sevilla, 1995.
153. **Martino, A ; Pifferi, PG ; Spagna, G.** Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochem.*, 31(3):287-293, 1996.
154. **Masson, G; Puech, JL; Moutounnet, M.** Composition chimique du bois de chene de tonellerie. *Bull OIV*, 785-786:635-657, 1996.
155. **Mateo, J.J.; Di Stefano, R.** Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiol.*, 14:583-591, 1997.
156. **Mateo, JJ;** Jiménez, M. Monoterpenes in grape juice and wines-review. *J. Chromatogr. A*, 35:95-103, 2000.
157. **Mayén, M; Zea, L; Mérida, J; Moyano, L; Toledano, A; Medina, M.** Compuestos fenólicos y del aroma diferenciadores de generosos tipo fino y oloroso. *Rev. Enólogos*, nº 36, 2005.
158. **Mazaira, J.L.; Losada, M.M.; Orriols, I.; Cacho, J.F.** Incidencia de la maceración pelicular en la variedad Godello. *La Semana Vitivinícola*. Nº 3141-3142:3595-3605, 2006.
159. **Mesas, JM; Alegre, MT.** El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 2(4):174-183, 1999.
160. **Moio, L; Ugliano, M; Gambuti, A; Genovese, A; Piombino, P.** Influence of clarification treatment on concentrations of selected free varietal aroma compounds and glycoconjugates in *Falanghina* (*Vitis vinífera* L) must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55(1):7-12, 2004.
161. **Möllering, H; Bergmeyer, HU.** Methods of enzymatic analysis 3rd ed. VI, 220-227, 1984.

BIBLIOGRAFÍA

162. **Moruno, EG; Ribaldone, M; Di-Stefano, R; Conterno, L; Gandini, A.** Study of five strains of *Saccharomyces cerevisiae* with regard to their metabolism towards geraniol. J. Int. Sci. Vigne Vin, 36(4): 221-225, 2002.
163. **Novo, M; Beltrán, G; Torija, MJ; Hierro, N; Poblet, M; Rozès, N; Guillamón, JM; Mas, A.** Fermentaciones a bajas temperaturas: resultados preliminares. Jornadas Científicas 99, Grupos de Investigación Enológica, Zaragoza, pp.98, 1999.
164. **OIV.** Recueil des Méthodes Internationales d'analyse des vins et des moûts. Office International de la Vigne et du Vin, París, 1990.
165. **Ollivier, C; Stonestreet, T; Larue, F; Dubordieau, D.** Incidence de la composition colloïdale des moûts blancs sur leur fermentescibilité. Conn. Vigne Vin, 37-42, 1987.
166. **Ordoñez, JA** (ed.). Tecnología de los Alimentos. Vol. I. Componentes de los alimentos y procesos. Ed. Síntesis, SA, Madrid, 1998.
167. **Orriols, I; Moreno, F.** Elaboración de vino Albariño. Incidencia de la maceración pelicular. Experiencias de 1989 y 1990. Vitivinicultura, 1: 41-45, 1992.
168. **Palacios, VM.** Desarrollo tecnológico en la elaboración industrial de vinos. Aplicación a bodegas de elaboración del Jerez. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz, 1998.
169. **Peinado, R.; Moreno, J; Bueno, JE; Moreno, JA; Mauricio, JC.** Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to prefermentative cryomaceration. Food Chem., 84: 585-590, 2004.
170. **Pellerin, P; Cabanis, JC.** Los glúcidos. En Flanzky, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 66-96, 2000.
171. **Pérez, L.** Formación y evolución de alcoholes superiores y otros componentes en vinos de Jerez. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. 1979.
172. **Pérez, PM; Morales, J.** Manual básico de laboratorio de bodega. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 1998.

173. **Pérez-Magariño, S; González-San José, ML.** Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.*, 96:197-208, 2006.
174. **Peynaud, E.** Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Ediciones Mundi-Prensa, 3ª Edición, 1989.
175. **Plata, C; Millán, C; Mauricio, JC; Ortega, JM.** Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.*, 20:217-224, 2003.
176. **Pretorius, IS.** Engineering designer genes for wine yeasts. *Aust. N.Z. Wine Indust. J.*, 14:42-47, 1999.
177. **Pretorius, IS.** Tailoring wine yeasts for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675-729, 2000.
178. **Pretorius, IS; Bauer, FF.** Meeting the consumer challenge through genetically customized wine yeast strains. *TRENDS Biotechnol.*, 20 (10): 426-432, 2002.
179. **Puig-Deu, M; López-Tamames, E; Buxaderas, S; Torre-Boronat, MC.** Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation. *Food Chem.*, 66(1):35-42, 1999.
180. **Querol, A.; Ramon, D.** The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7:73-78, 1996.
181. **Querol, A.** Modificación genética de levaduras vínicas. *Revista ACE de Enología*, nº 3, agosto 2000.
182. **Ramey, D; Bertrand, A; Ough, CS; Singleton VL; Sanders, E.** Effects of skin-contact temperature on *Chardonnay* must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:99-106, 1986.
183. **Ramón, D.** Mejora de las levaduras vínicas mediante técnicas de ingeniería genética. Ed.: Carrascosa, AV; Muñoz, R; González, R. *Microbiología del vino*. AMV Ediciones, Madrid, 2005.
184. **Rapp, A.;Versini, G.;Engel, L.** Determination of 2-aminoacetophenone in fermented model wine solutions. *Vitis*, 34 (3):193-194, 1995.

185. **Rauhut, D; Shefford, PD; Kurbel, H; Lohnerzt, O; Roll, C.** Effect of diverse oenological treatments to avoid occurrence of atypical aging and related off-flavours in wine. 7^{ème} Symposium Internacional d'Oenologie de Bordeaux, 376-379, 2003.
186. **Razungles, A; Blouin, J; Boulet, JC; Escudier, JL; Feuillat, M; Flanzy, C; Peyron, D.** Vinificación en tinto. En Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 462-496, 2000.
187. **Reed, G; Nagodawithana, TW.** Yeast Technology (2nd ed.), Van Nostrand Reinhold, New York/Technolo, 1991
188. **Reynolds, AG; Wardie, DA.** Significance of viticultural and enological practices on monoterpene flavorants of british columbia grown *Vitis vinifera* berries and juices. Die Wein Wissenschaft, 48: 194-202, 1993.
189. **Reynolds, AG; Wardle, DA.** Flavour development in vineyard: impact of viticultural practices on grape monoterpenes and their relationship to wine sensory response. S. Afr. J. Enol. Vitic., 18(1):3-18, 1997.
190. **Ribereau-Gayón, P; Boidron, JN; Terrier, A.** Aroma of muscat grape varieties. J. Agric. Food Chem. 23:1042-1047, 1975.
191. **Ribereau-Gayón, P.** Les phénomènes oxydatifs dans les moûts et les vins. En : Ribereau-Gayon P, Sudraud, P. *Actualités œnologiques et viticoles*, Dunod, París, 205-213, 1981.
192. **Ribereau-Gayón, P; Dubordieu, D; Doneche, B; Louvand, A.** Tratado de enología (Tomo I). Microbiología del vino. Vinificaciones. Ed. Hemisferio Sur y Mundi-Prensa, 2003.
193. **Riu-Aumatell, M.** Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta. PhD thesis. Barcelona University, Spain, 2005.
194. **Riu-Aumatell, M; Bosch-Fusté, J; López-Tamames, E; Buxaderas, S.** Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. Food Chem., 95(2):327-342, 2006.

195. **Robertson, JA; Meredith, FI; Horvat, RJ; Senter, SD.** Effect of storage and maturity on the physical and chemical characteristics and volatile constituents of peaches (CV. Cresthaven). *J. Agric. Food Chem.*, 38:620-624, 1990.
196. **Rodríguez, A.; García, J; Garrido, J; Ancín, C.** Influence of decantation of *Vinura* must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. *Food Res. Int.* 32:683-689, 1999.
197. **Rodríguez, F.** (ed.). *Ingeniería de la Industria Alimentaria. Vol. III. Operaciones de conservación de alimentos.* Ed. Síntesis, SA, Madrid, 2002.
198. **Rojas, V; Gil, JV; Piñaga, F; Manzanares, P.** Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine. *Yeasts Int. J. Food Microbiol.*, 70:283-89, 2001.
199. **Roldán, A; Palacios, V; Peñate, X; Benítez, T; Pérez, L.** Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in sherry region. *J. Food Eng.*, 75:375-382, 2006.
200. **Salinas, MR.** Las coordenadas cromáticas CIELAB; un mejor sistema para medir el color del vino. *Investigación y Ciencia. Revista ENÓLOGOS*, 28 :24-27, 2004.
201. **Sapis, JC.** Contribution à l'étude dans les vins du tyrosol, du tryptophol, de l'alcool phényléthylique et de la [gamma]-butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique. Ph.D. Thesis, Bordeaux University, 1967.
202. **Sapis, JC.** La macération pelliculaire préfermentaire en vinification en blanc. Incidence sur les caractéristiques analytiques et organoleptiques des vins. *Rev. Franc. Oenol.*, Julio/Agosto, 153, 1995.
203. **Sánchez-Palomo, E; Díaz-Maroto, MC; González-Viñas, MA; Pérez-Coello, MS.** Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chem.*, 92:627-635, 2005.
204. **Sauvageot, F; Vivier, P.** Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48:187-192, 1997.
205. **Saxby, MJ.** *Food taints and off flavours.* 2nd Edition Blackie Academic & Professional, 1996.

206. **Schaeffer, A; Berger, JL; Blouin, J; Dupuy, P.** Mejoras y correcciones de la materia prima. En Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 540-557, 2000.
207. **Schereier, P.** Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 12:59-111, 1979.
208. **Sefton, MA; Francis, IL; Williams, PJ.** Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oak woods used in wine and spirit maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 38:2045-2049, 1990.
209. **Selli, S; Cabaroglu, T; Canbas, A; Erten, H; Nurgel, C.** Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. *Muscat* and *Narince* grown in Turkey. *Food Chem.*, 81: 341-347, 2003.
210. **Selli, S; Canbas, A; Cabaroglu, T; Erten, H; Günata, Z.** Aroma components of cv. *Muscat of Bornova* wines and influence of skin contact treatment. *Food Chem.*, 94, 319-326, 2006a.
211. **Selli, S; Canbas, A; Cabaroglu, T; Erten, H; Lepoutre, J; Günata, Z.** Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv *Narince*. *Food Control*, 17, 75-82, 2006b.
212. **Simonato, B; Mainente, F; Spinelli, P; Battista, G; Ferrarini, R.** Effect of cryoextraction on phenols fractions of must derived from white grape varieties. ASEV 56th Annual Meeting, pp. 36-37, June 2005
213. **Singleton VL; Sieberhagen, HA; Wet, P. Van Wyk, CJ.** Composition and sensory qualities of wines prepared from white grapes by fermentation with and without grape solids. *Am. J. Enol. Vitic.* 26(2):62-69, 1975.
214. **Singleton, VL; Zya, J; Trousdale, E.** White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO₂ content and pomace contact time. *Am. J. Enol. Vitic.* 31:14-20, 1980.
215. **Soufleros, E; Bertrand, A.** Rôle de la souche de levure dans la production des substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. *Conn. Vigne Vin*, 9:273-303, 1979.

216. **Spagna, G; Romagnoli, D; Martino, A; Bianchi, G; Pifferi, PG.** A simple method for purifying glicosidases: α -L-rhamnofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of *Moscato* wine. Part I. Enzyme Microb. Technol., 22:298-304, 1998.
217. **Spagna, G; Barbagallo, RN; Martino, A; Pifferi, PG.** A simple method for purifying glicosidases: α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of *Moscato* wine. Enzyme Microb. Techn., 27:522-530, 2000.
218. **Spagna, G; Barbagallo, RN; Greco, E; Manenti, I; Pifferi, PG.** A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. Enzyme Microb. Technol., 30:80-89, 2002a.
219. **Spagna, G; Barbagallo, RN; Palmeri, R; Restuccia, C; Giudici, P.** Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. Enzyme Microb. Technol., 31:1036-1041, 2002b.
220. **Strauss, CR; Wilson, B; Williams, PJ.** Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera*. J. Agric. Food Chem., 36:569-573, 1988.
221. **Suárez-Lepe, JA.** Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodegas. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa, 1997.
222. **Suárez-Lepe, JA.** Impacto de levaduras y bacterias en los aromas vínicos fermentativos. I Encuentro International de Ciencias Sensoriales y de la Percepción, Barcelona y Sant Sadurní d'Anoia, Rubes Editorial SL, pp 43-45, 2002.
223. **Suárez-Lepe, JA.** Perfil sensorial del vino tras la fermentación maloláctica. ACE Revista de Enología, nº 38, octubre 2003.
224. **Tamborra, P; Martino, M; Esti, M.** Laboratory tests on glycosidase preparations in wine. Analytica Chimica Acta, 513: 299-303, 2004.
225. **Terrier, A; Blouin, J.** Observations sur l'extraction des jus de raisins blancs. Conn. Vigne Vin, 9:273-303, 1975.

- 226. **Tominaga, T; Blanchard, L; Darriet, P; Dubordieu, D.** A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grapes varieties. *J. Agric. Food Chem.* 48:1799-1802, 2000.
- 227. **Torrens, J.** El análisis del aroma en el control de calidad de los vinos. *Revista ACE de Enología*, nº 5, diciembre 2000.
- 228. **Ubeda, J; Briones, A.** Characterization of differences in the formation of volatiles during fermentation within synthetic and grape musts by wild *Saccharomyces* strains. *Lebensm.-Wiss u.- Technol.*, 33: 408-414, 2000.
- 229. **Ubeda, JF; González, F; González, MA.** Evaluation of the formation of volatiles and sensory characteristics in the industrial production of white wines using different commercial strains of the genus *Saccharomyces*. *Food Cont.*, 11: 143-147, 2000.
- 230. **Usseglio-Tomasset, L.** L'alcol B-feniletílico nei vini. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano* 20:10-35, 1967.
- 231. **Usseglio-Tomasset, L.** Ethyl acetate and higher alcohols in wines. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano* 24:236-253, 1971.
- 232. **Usseglio-Tomasset, L; Bosia, PD; Di Stefano, R; Castino, M.** Oggettiva influenza del contatto con i lieviti sulle caratteristiche degli spumanti preparati con il metodo classico. *Vini d'Italia*, 142:3-9, 1983.
- 233. **Usseglio-Tomasset, L.** Química enológica. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1998.
- 234. **Valero, E; Millán, C; Ortega, JM.** Influence of prefermentative treatment on the fatty acid content of *Saccharomyces cerevisiae* (M3 30-9) during alcoholic fermentation of grape must. *J. Biosci. Bioeng.*, 91(2):117-122, 2001.
- 235. **Valero, E; Moyano, L; Millan, MC; Medina, M; Ortega, JM.** Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chem.*, 78:57-61, 2002.
- 236. **Valcárcel, MC.** Incidencia de técnicas vitícolas y enológicas en el potencial aromático de variedades de vid en clima cálido. PhD. Thesis, Cádiz University, Spain, 2006.

237. **Varela, F; Calderón, F; González, MC; Colomo, B; Suárez, JA.** Effect of clarification on the fatty acid composition of grape must and the fermentation kinetics of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 209:439-444, 1999.
238. **Viegas, CA; Rosa, FM; Sá-Correia, I; Novais, JM.** Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:21-28, 1989.
239. **Visser, J; Voragen, AGJ.** (eds.). *Progress in Biotechnology vol. 14: Pectins and Pectinases.* Elsevier Science, Amsterdam, 1996.
240. **Wibowo, D; Eschenbruch, R; Davis, CR; Fleet, GH; Lee, TH.** Occurrence and growth of lactic bacteria in wine: a review. *Am J. Enol. Vitic.*, 36:302-313, 1985.
241. **Yanai, T; Sato, M.** Isolation and properties of β -glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(3):231-235, 1999.
242. **Zamora, F.** Las paradas de fermentación. *Investigación y Ciencia. Enólogos*, 29:28-32, 2003.
243. **Zea, L; Moreno, J; Ortega, JM; Medina, M.** Content of free terpenic compounds in cells and musts during vinification with three *Saccharomyces cerevisiae* races. *J. Agric. Food Chem.*, 43:1110-1114, 1995a.
244. **Zea, L; Moreno, J; Ortega, JM; Mauricio, JC; Medina, M.** Comparative study of the γ -butirolactone and pantolactone contents in cells and musts during vinification by three *Saccharomyces cerevisiae* races. *Biotechnol. Lett.* 12:1351-1356, 1995b.
245. **Zea, L; Moreno, J; Medina, M.** Estudio de los contenidos en células y mostos de compuestos del aroma durante la vinificación con tres razas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Química e Industria (QUIBAL)*, pp. 18-25, 1997.
246. **Zoecklein, BW; Marcy, JE ; Williams, JM ; Jasinski, Y.** Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl-glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of white *Riesling* (*Vitis vinifera*, L) wines. *J. Food Compos. Anal.* 10:55-65, 1997.

BIBLIOGRAFÍA

247. **Zohre, DE; Erten, H.** The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. Process Biochem., 38:319-324, 2002.

